

GPI-verankerte Chemokine als Adjuvantien in der Tumorthherapie



Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig Maximilians Universität München

Sophia Böcker

**Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

GPI-verankerte Chemokine als Adjuvantien in der Tumorthherapie



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig Maximilians Universität München

**vorgelegt von Sophia Böcker
aus Essen**

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Erstgutachter:	Prof. Dr. Peter J. Nelson
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann Priv. Doz. Dr. Martin Eichhorn
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	20.06.2013

Inhalt

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Die Gruppe der Chemokine und ihre Rezeptoren	2
2.2	Rekrutierung von Leukozyten	5
2.3	Tumorigenese und Chemokine	6
2.4	CXCL10	9
2.5	CX3CL1	10
2.6	Glykosylphosphatidylinositol verankerte Proteine	12
3	Hintergrund und Zielsetzung	14
4	Material und Methoden	16
4.1	Material	16
4.1.1	Geräte	16
4.1.2	Software	17
4.1.3	Chemikalien	17
4.1.4	Materialien für die Zellkultur	18
4.1.5	Materialien für die Mikrobiologie	20
4.1.6	Materialien für die Proteinchemie	21
4.1.7	Reagenzienpakete	22
4.1.8	Enzyme	22
4.1.9	Vektoren	23
4.1.10	Primer	23
4.1.11	Antikörper	23
4.1.12	Proteine	24
4.1.13	Größenstandards	25
4.1.14	Sonstige Materialien	25
4.2	Molekularbiologische Methoden	26
4.2.1	Restriktionsverdau von DNA	26
4.2.2	Ligation von DNA-Fragmenten	26
4.2.3	Transformation von E.coli DH5α	26
4.2.4	Präparation von Plasmid-DNA aus E.coli DH5α	26
4.2.5	Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel	27
4.2.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	27
4.2.7	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	27

4.2.8	RNA-Isolation	28
4.2.9	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	28
4.2.10	Reverse Transkription	28
4.2.11	Klonierung von Chemokinkonstrukten	29
4.3	Zellulär-immunologische Methoden	31
4.3.1	Zellkultur	31
4.3.2	Stabile Transfektion von Eukaryotenzellen	33
4.3.3	Durchflusszytometrie (FACS)	33
4.3.4	Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus entnommenen Milzen	35
4.4	Proteinchemische Methoden	36
4.4.1	Säulenchromatographie	36
4.4.2	SDS-PAGE	37
4.4.3	Silberfärbung	38
4.4.4	Westernblot	38
4.4.5	ELISA	39
4.5	Weitere in-vitro Methoden	39
4.5.1	Transiente Transfektion von HMECs	39
4.5.2	Messung der Luciferaseaktivität	40
4.5.3	Fluoreszenzmikroskopie	40
4.5.4	Leukozytenadhäsion an Endothelzellen unter kontinuierlichem Fluss	41
4.5.5	Messung der Proliferation von Endothelzellen	44
4.5.6	Migrationsversuch	44
5	Ergebnisse	46
5.1	Transiente Transfektion von immortalisierten Endothelzellen	46
5.1.1	Subklonierung der CXCL10-Konstrukte in den pIRES2-eGFP Vektor	46
5.1.2	Transiente Transfektion mittels Magnetofektion	47
5.1.3	Transiente Transfektion mittels Elektroporation	50
5.2	Proteinchemische Isolation von CXCL10-(mucin)-mycTag-GPI	52
5.2.1	Klonierung und Expression der Chemokinkonstrukte	52
5.2.2	Proteinchemische Aufreinigung der Chemokinkonstrukte mittels FPLC	59
5.3	Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen unter kontinuierlichem Fluss	65
5.3.1	Nachweis der Expression von CXCR3 auf Leukozyten	65
5.3.2	HUT78 Zellen binden in geringem Maß an mit pIRES2-CXCL10-mucin-GPI transient transfizierte Endothelzellen	67
5.3.3	Adhäsion von Monozytenzellen an Endothelzellen, welche die Konstrukte inkorporiert haben, unter Flussbedingungen	69

5.4	Hemmung der Zellproliferation durch CXCL10	70
5.5	Migration von Splenozyten	72
6	Diskussion	74
7	Anhang	82
7.1	Sequenzen von CXCL10-GPI und CXCL10-muzin-GPI	82
8	Abkürzungen	84
9	Literatur	87

1 Zusammenfassung

Die Rekrutierung von Zellen spielt in zahlreichen biologischen Prozessen, wie zum Beispiel Entzündungsreaktionen oder der Abwehr maligner Tumoren, eine zentrale Rolle. Eine bedeutende Funktion in diesem komplexen Vorgang wird den Chemokinen zuteil.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Wirkung der Chemokine auf die Migration bestimmter Leukozyten gezielt nutzen und somit auch therapeutisch einsetzen zu können. Hierfür wurden neuartige Fusionsproteine generiert. Das Chemokin CXCL10, N-terminal gelegen, wurde mit der Muzindomäne des Chemokins CX3CL1 verbunden. Weiterhin erfolgte die Fusion mit einem Glykosylphosphatidylinositol (GPI-) Anker, welcher am C-Terminus des Proteins, nach seiner Injektion in einen Tumor, zu einer Verankerung des Proteins in Tumor- oder Stromazellen führen soll. Auf diese Weise könnte eine lokal begrenzt erhöhte Konzentration von CXCL10 in Kombination mit der Muzindomäne zu einer vermehrten Rekrutierung von CXCL10-Rezeptor positiven T- und NK-Zellen und somit zu einer Elimination von entarteten Zellen führen. Nach Klonierung der Chemokinkonstrukte und ihrer Expression in eukaryotischen Zellen, konnten auch immortalisierte mikrovaskuläre Endothelzellen erfolgreich mit den GPI-verankerten Chemokinen transfiziert werden. Der Nachweis der Oberflächenexpression gelang durch FACS-Analysen sowie durch Fluoreszenzmikroskopie. Die Fusionsproteine wurden außerdem affinitätschromatographisch aufgereinigt. Anschließend konnte gezeigt werden, dass sich die Proteine in die Membran mikrovaskulärer Endothelzellen integrieren können und auf deren Oberfläche präsentiert werden. Auch die Verankerung durch den Membrananker wurde bewiesen. Der erhoffte Effekt der Chemokinkonstrukte, Leukozyten aus dem Blutstrom zu rekrutieren, konnte mit Hilfe von Adhäsionsversuchen unter kontinuierlichem Fluss, demonstriert werden. Hier zeigten sich eine geringe Wirkung der transfizierten Konstrukte sowie eine deutlichere Wirkung der reinkorporierten Fusionsproteine auf das Verhalten von T- und NK-Zellen. Die muzinartige Domäne schien in diesem Zusammenhang eine zentrale Rolle einzunehmen. Weiterhin wurde in einem Proliferationsversuch ein hemmender Effekt der Fusionsproteine auf Endothelzellen nachgewiesen. Ein Migrationsversuch mit murinen Splenozyten demonstrierte den chemotaktischen Effekt der GPI-verankerten Chemokine auf T-Zellen und NK-Zellen.

In Zusammenschau der Versuche, scheinen die generierten Fusionsproteine fähig zu sein, zu einer lokal verstärkten Rekrutierung von bestimmten Leukozyten zu führen. Hierdurch könnten sie einen therapeutischen Beitrag zur Bekämpfung maligner Erkrankungen im Rahmen von Immuntherapien leisten.

2 Einleitung

Das Immunsystem stellt für den Körper einen zentralen Schutzmechanismus gegen Infektionen, Fremdkörper oder auch entartete Zellen dar. Es umfasst komplexe Vorgänge mit einem koordinierten Zusammenwirken von zellulären und löslichen Faktoren der Immunantwort sowie der Mikrovaskulatur. Eine Schädigung von Gewebe führt zur Freisetzung von Signalstoffen, welche unter anderem eine Durchwanderung von Leukozyten durch das Endothel sowie eine Akkumulation und Aktivierung von Leukozyten im Gewebe zur Folge haben. Eine sehr wichtige Rolle in diesem Prozess übernehmen die Zytokine als Immunregulatoren in aktivierender, supprimierender oder modulierender Funktion.

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Ansätze verfolgt, die Immunantwort des Organismus in der Tumorthherapie zu nutzen. Mittlerweile hat sich die Immuntherapie als viertes Standbein, neben Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie, in der Onkologie etabliert. Die therapeutische Bandbreite reicht vom Einsatz onkolytischer Viren, modulierender Antikörper oder extrakorporaler DC-Aktivierung bis hin zur adoptiven T-Zell Therapie, um nur einige Strategien zu nennen (Choi, 2012; Vollmer, 2009).

2.1 Die Gruppe der Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemotaktische Zytokine (Chemokine) stellen eine Subgruppe der Zytokine mit einem Molekulargewicht zwischen sieben und 14 kDa dar und umfassen fast 50 identifizierte Mitglieder im Menschen (Moser, 2001; Balkwill, 2004; Zlotnik, 2000; 2006; Blanchet, 2012). Chemokine nehmen an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse teil. Sie beeinflussen beispielsweise die Regulation der embryonalen Entwicklung und Angiogenese, die Homöostase und die Immunabwehr. Vier Untergruppen der Chemokine werden unterschieden: die XC-Chemokine, die CC-Chemokine, die CXC-Chemokine sowie die CX₃C-Chemokine (Alexander, 2011). Eine weitere Untergruppe stellt die Gruppe der CX Chemokine dar, welche im Zebrafisch identifiziert werden konnte (Nomiya, 2008; 2010). Die Anzahl sowie Anordnung von Cysteinresten am Aminoterminus der Proteinfamilie führt zu deren Nomenklatur (Premack, 1996; Bagglioni, 1997; Bazan, 1997). Während bei CC-Chemokinen die Cysteinreste (C) direkt benachbart sind, werden diese bei den CXC-Chemokinen durch eine beliebige Aminosäure (X) getrennt. Die CXC-Chemokine können je nach Vorhandensein der Tripeptidfolge Glutamat-Leucin-Arginin (ERL) am N-terminalen Ende weiterhin in zwei funktionell unterschiedliche Gruppen (ERL⁺-CXC- und ERL⁻-CXC-Chemokine) unterteilt werden (Murphy, 2000). Die C-Chemokine Lymphotactin α und β , welche nur einen Cysteinrest besitzen (Kelner, 1994) sowie das CX₃C -Chemokin Fractalkine

mit drei Aminosäuren zwischen den Cysteinresten (Combadiere, 1998), stellen die einzigen Vertreter ihrer Gruppen dar.

Chemokine entfalten ihre Wirkung durch Bindung an Chemokinrezeptoren. Die derzeit 23 bekannten humanen Rezeptoren werden nach den Bindungspartnern eingeteilt: C-Rezeptoren (XCR1), CC-Rezeptoren (CCR1-10), CXC-Rezeptoren (CXCR1-7), CX₃C - Rezeptoren (CX₃CR1) (Alexander, 2011). Die Rezeptoren binden im Allgemeinen ausschließlich Chemokine, welche ihrer Subgruppe angehören, hier sind sie allerdings variabel (Lindow, 2003). Ausnahmen bilden der DARC/Duffy-, der D6-Rezeptor sowie CCxCKR, welche sowohl CXC- als auch CC-Chemokine binden können, durch sie jedoch nicht aktiviert werden. Es wird angenommen, dass sie Einfluss auf die Regulation des Chemokinspiegels nehmen (Darbonne, 1991; Mantovani, 2006). Alle Rezeptoren sind integrale Membranproteine mit sieben membrandurchspannenden Helices. Sie können Homo- oder Heterodimere bilden, die sich funktionell unterscheiden (Lapham, 1999). Die Liganden binden an den extrazellulären N-Terminus der Rezeptoren und führen zu einer Phosphorylierung von Serin/Threoninresten des zytoplasmatischen C-Terminus (Kulbe, 2004). Die Signaltransduktion führt, mit Ausnahme von CXCR7, über heterodimere inhibitorische GTP-bindende Proteine (G-Proteine) zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums (Rossy, 2000; Sallusto, 2000; Murphy, 2002; Rajagopal, 2010). Die Dauer und Stärke der Signaltransduktion können sowohl von der Internalisierung des Rezeptorkomplexes, als auch durch eine Trennung des Rezeptors vom G-Protein beeinflusst werden (Balkwill, 2004).

Es können zum einen auf einer Zelle verschiedene Chemokine an einen Rezeptor (Zhang, 1999), zum anderen unterschiedliche Rezeptoren dasselbe Chemokin binden (Morohashi, 1995). Durch diese Chemokin-Rezeptorbindungsmöglichkeiten ergeben sich für die Untergruppen der Leukozyten spezifische funktionelle Einheiten und somit bestimmte Wirkungsmuster der verschiedenen Chemokine (Baggilioni, 1998).

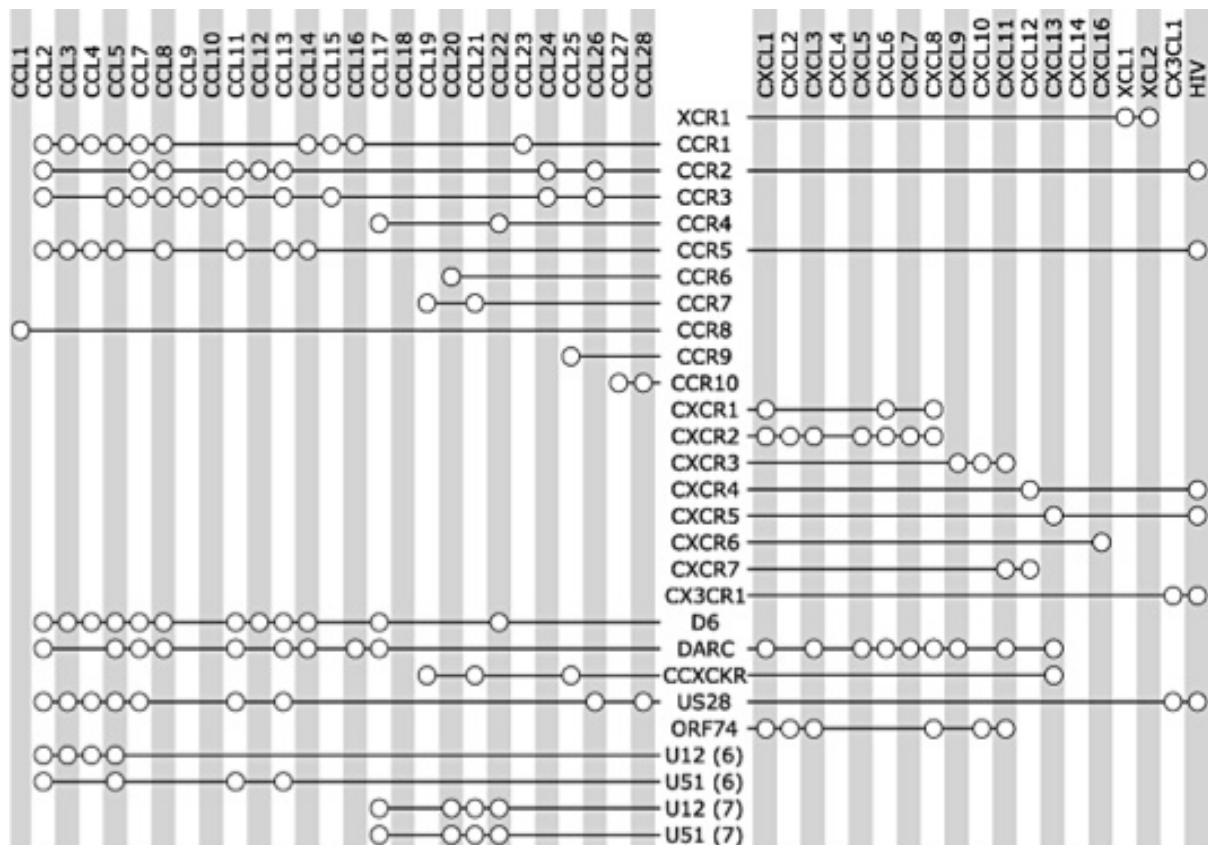


Abbildung 1: Chemokinrezeptoren und deren Liganden. Die Abbildung verdeutlicht das Spektrum der Bindungsvariationen von Chemokinen und ihren Rezeptoren. Humane Chemokinrezeptoren (XCR1-CX3CR1), Decoy Rezeptoren (D6-CCxCKR), virale Chemokinrezeptoren (U28-U51). Abbildung nach Scholten, 2012

Neben der Einteilung nach ihrer Struktur können die Chemokine auch in Hinblick auf ihre Funktion unterteilt werden (Mantovani, 2006). Sowohl die Chemokine als auch ihre Rezeptoren können in konstitutionelle (homöostatische) sowie induzierbare (inflammatorische) unterschieden werden. Konstitutionelle Expression kann zu einer Induktion der Einwanderung gewebsspezifischer Leukozyten führen (Baggiolini, 2000). Außerdem ist sie an der Kontrolle der Angiogenese (Feil, 1998) und der Regulation des Nervenwachstums beteiligt (Hesselgesser, 1997). Die induzierten Chemokine (CCL2-CCL5, CCL11, CCL16, CXCL1-5, CXCL7-10 und CX3CL1) und deren Rezeptoren spielen durch Ausübung oben beschriebener Mechanismen insbesondere bei Entzündungsreaktionen eine Rolle. Ihre Expression wird durch inflammatorische Zytokine, wie IL1, TNF α oder IFN γ , induziert. Einige Chemokine wie CXCL10 können auch beiden Kategorien zugeordnet werden (Moser, 2004).

Chemokine können jedoch nicht nur die genannten Rezeptoren, sondern auch negativ geladene Zelloberflächen oder extrazelluläre Matrixproteine binden (Kim, 2004).

Glykosaminoglykane (GAGs) sind sulfatierte Polysaccharide, welche entweder an Proteinen immobilisiert oder in löslicher Form vorliegen können. Die Bindung der Chemokine an GAGs wird über ihren C-Terminus oder Loops, welche der N-terminalen Domäne gegenüberliegen, vermittelt (Lortat-Jacob, 2002). Immobilisierte GAGs sind in der Lage, die lokale Chemokinkonzentration zu erhöhen und den Rezeptoren zu präsentieren (Kuschert, 1999).

2.2 Rekrutierung von Leukozyten

Chemokine spielen bei der Interaktion des Endothels mit Leukozyten im Rahmen physiologischer oder entzündlicher Prozesse eine wichtige Rolle, da sie einerseits die Adhäsion der Leukozyten verstärken und andererseits eine gerichtete Migration (Chemotaxis) in Richtung der höchsten Konzentration des Chemokins induzieren können (Baggiolini, 1994; Vicente, 1998).

Die selektive Rekrutierung von Leukozyten aus dem peripheren Blut über das vaskuläre Endothel der postkapillären Venolen in das interstitielle Gewebe spielt eine zentrale Rolle bei sämtlichen Entzündungsreaktionen und lässt sich in verschiedene Schritte gliedern (Springer, 1994). Der erste Schritt ist das „Rollen“ der Leukozyten auf der Oberfläche der Endothelzellen. Die hierfür notwendige Aktivierung des Endothels führt zu einer Exprimierung von Plättchen (P)-Selektinen an seiner Oberfläche, welche mit Kohlenhydratepitopen bestimmter Glykoproteine (Sialyl-Lewis^X-Einheit) der Leukozyten eine lockere, reversible Bindung eingehen (Maghazachi, 1994). P-Selektine werden wenige Minuten nach Aktivierung des Endothels auf dessen Oberfläche präsentiert, während das Endothel (E)-Selektin erst Stunden nach Aktivierung durch Lipopolysaccharid (LPS) oder proinflammatorische Zytokine wie IFN γ oder TNF α erscheint. Anschließend kommt es zu einer Interaktion zwischen den auf den rollenden Leukozyten exprimierten β_1 und β_2 Integrinen und Molekülen der Immunglobulin-Superfamilie, den *cellular adhesion molecules* (CAMs) auf Endothelzellen. Bei Entzündungsreaktionen hauptsächlich beteiligt sind das β_1 Integrin *very late antigen* (VLA-4) sowie die β_2 Integrine *leucocyte function antigen* (LFA)-1, *macrophage antigen* (MAC)-1 und p150, 95. Das β_2 Integrin LFA-1 beispielsweise bindet an das Immunglobulinfamilienprotein ICAM-1, während das β_1 Integrin VLA-4 an VCAM-1 bindet (Dal Canton, 1995; Springer 1994). Normalerweise besteht eine nur schwache Bindung zwischen CAMs und Integrinen, die den Scherkräften des Blutes nicht standhält, jedoch durch eine Konformationsänderung der Integrine verstärkt werden kann. Diese Konformationsänderung wird durch Chemokine bewirkt, welche entweder von dem Endothel selbst oder von den Leukozyten exprimiert werden und an spezifische Glukosaminoglykane an der Oberfläche des Endothels binden, wie oben beschrieben wurde (Witt, 1994; Tanaka, 1993; Rollins, 1990; Springer 1995). Letztlich durchwandern die Leukozyten entlang einem

Chemokingradienten das aktivierte Endothel (Diapedese) und gelangen auf diese Weise an den Ort der Entzündung (Leppert, 1995).

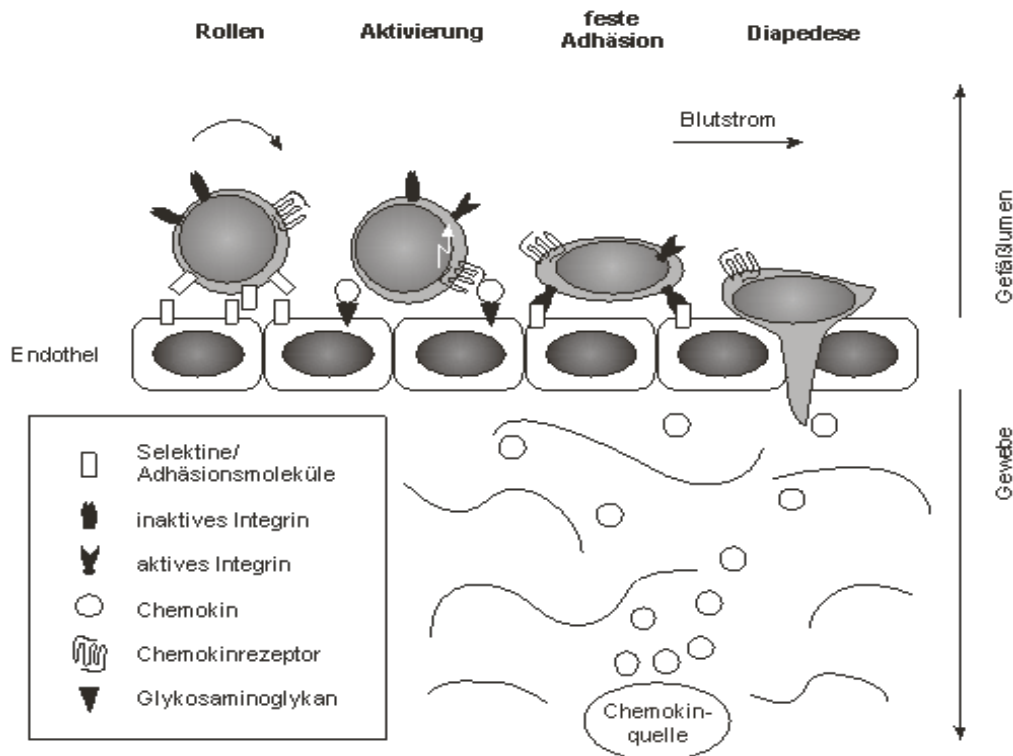


Abbildung 2: Stufenmodell der selektiven Rekrutierung von Leukozyten. Dargestellt sind die Schritte der Extravasation einer Zelle in das Gewebe. Zunächst erfolgt das Rollen entlang des Endothels, welches vor allem durch Selektine gesteuert wird. Anschließend wird die Konformation der Integrine auf der Zelle geändert, was eine feste Adhäsion sowie die transendotheliale Migration entlang eines Chemokingradienten ermöglicht. Abbildung modifiziert nach Schaeferli, 2005.

Bei der Wanderung der Leukozyten durch die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix spielen auch MMPs (Matrixmetalloproteinasen) eine wichtige Rolle, welche in der Lage sind, nahezu alle Bestandteile der extrazellulären Matrix zu spalten und dadurch die Migration von Zellen zu ermöglichen. Ihre Expression wird ebenfalls durch bestimmte Chemokine reguliert (Xia, 1996).

2.3 Tumorigenese und Chemokine

Chemokine spielen nicht nur eine wichtige Rolle im Rahmen der Entzündung. Die beschriebenen Vorgänge während der Rekrutierung von Leukozyten können auch bei der körpereigenen Abwehr von malignen Tumoren beobachtet werden. Hier können Chemokine durch ihre Fähigkeit, die Anzahl von immunkompetenten Zellen in der Tumorumgebung zu erhöhen, zu einer Elimination entarteter Zellen führen. Insbesondere CD8⁺ T-Zellen sowie

NK- (Natürliche Killer-) Zellen stellen eine wichtige Barriere bei der Tumorentstehung dar (Zitvogel, 2006). Die Bedeutung des Immunsystems in der Tumorentstehung und Tumorabwehr wird als Immunüberwachung bezeichnet und wurde von Burnet und Thomas bereits in den 70er Jahren beschrieben (Burnet, 1970; Thomas, 1982).

Die Funktionen der Chemokine sind jedoch weitaus komplexer. Inzwischen ist bekannt, dass sie selbst sowie die entsprechenden Rezeptoren von nahezu allen Zellen des Körpers, einschließlich maligner Tumorzellen, gebildet beziehungsweise exprimiert werden können (Arya, 2003). Demzufolge sind sie an verschiedenen Prozessen, welche mit malignen Tumoren assoziiert sind, beteiligt. Sie beeinflussen hier in komplexer Weise das Tumorwachstum, das Einsprossen von Blutgefäßen (Angiogenese), die Invasion der malignen Zellen sowie die Metastasierung. Die Gruppe der CXC-Chemokine scheint in diesem Kontext den höchsten Stellenwert zu besitzen.

Krebs entsteht als Folge erworbener Mutationen, durch welche sich den betroffenen Zellen ein Selektionsvorteil bietet. Meist kommt es zu einer Aktivierung oder Inaktivierung der mutierten Gene. Diese Veränderungen im Erbgut ermöglichen den Zellen, trotz wachstumshemmender Signale oder vermehrter Apoptose, zu proliferieren, so dass ein Tumor entstehen kann. Die Entwicklung dieses Tumors hängt insbesondere von der Neoangiogenese ab. Diese gewährleistet sowohl die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff, als auch den Abtransport von anfallenden Produkten.

Chemokine beeinflussen diesen Prozess in unterschiedlicher Weise:

ERL⁺-CXC-Chemokine (CXCL1-3, CXCL5-8) fördern die Angiogenese (Strieter, 1995; Busuttill, 2009). Dies kann entweder direkt durch Bindung des Chemokins an seinen Rezeptor auf Endothelzellen erfolgen oder indirekt, indem inflammatorische Zellen aktiviert werden, angiogenetische Faktoren wie VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) oder bFGF (engl. *basic fibroblast growth factor*) zu sezernieren. Alle ERL⁺-CXC-Chemokine binden den Rezeptor CXCR2, während nur CXCL6 und 8 in der Lage sind CXCR1 zu aktivieren. In erster Linie ist CXCR2 für die Aktivierung der Angiogenese verantwortlich (Addison, 2000; Singh, 2011).

ERL⁻-CXC-Chemokine hingegen führen zu einer Hemmung der Angiogenese. Hierzu gehören die Chemokine CXCL4, 9, 10, 11 und 14 (Strieter, 1995). CXCL4 wurde als erstes angiostatisches Chemokin beschrieben. Es hemmt die Chemotaxis endothelialer Zellen sowie die Effekte von VEGF und bFGF (Gupta und Singh, 1994). CXCL10 zum Beispiel wird im Rahmen von humanen NSCLCs (engl. *non-small-cell lung carcinoma*) in großen Mengen produziert. In SCID (engl. *severe combined immunodeficiency*) Mäusen zeigt sich eine

inverse Korrelation zwischen der Produktion von CXCL10 und der Tumorigenese der malignen Zellen. Nach Injektion von CXCL10 in den Tumor der Lunge zeigte sich ein deutlicher Rückgang des Wachstums sowie der Neovaskularisation (Arenberg, 1996). Die CXC Chemokine mit angiostatischer Wirkung binden insbesondere an den Rezeptor CXCR3. Dieser wurde zuerst auf Endothelzellen entdeckt (Soto, 1998). Durch Splicen der mRNA (*messenger* Ribonukleinsäure) entstehen drei Unterformen des Rezeptors: CXCR3A, CXCR3B und CXCR3-alt (Lasagni, 2003). Hauptsächlich über CXCR3B werden die beschriebenen angiostatischen Wirkungen vermittelt (Salcedo, 2000, Muller, 2010).

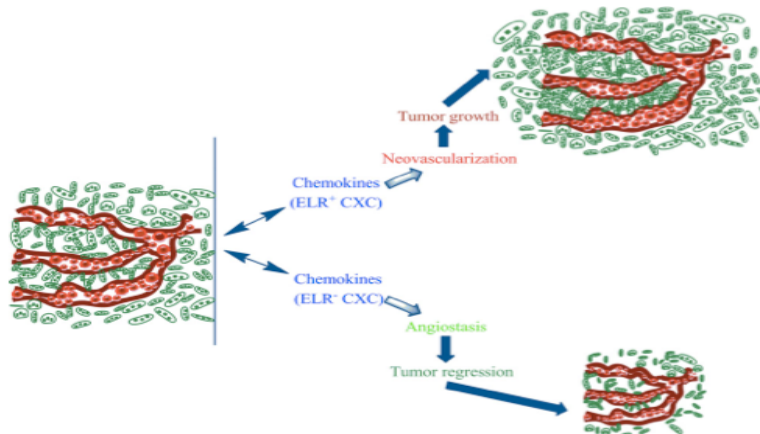


Abbildung 3: Effekte unterschiedlicher Subgruppen der CXC-Chemokine auf den Prozess der Angiogenese. Verdeutlicht wird der fördernde Effekt von ELR^+ -Chemokinen auf die Angiogenese im Bereich eines Tumors. ELR^- -Chemokine hingegen zeigen angiostatische Effekte und führen somit zu einer Hemmung des Tumorwachstums. Abbildung nach Qingchan, 2012.

Auf der anderen Seite werden auf einigen Tumoren Chemokinrezeptoren in erhöhter Menge exprimiert, so dass angenommen wurde, dass die daraufhin erhöhte Chemokinkonzentration zu einer Wanderung von Tumorzellen in das entsprechende Gewebe führt (Moore, 2001; Wang, 1998). Brustkrebszellen zum Beispiel exprimieren vermehrt CXCR4 (Müller, 2001). Bei Melanomzellen wurde gezeigt, dass CXCL1 sowie CXCL8 als Wachstumsfaktoren zu einer Progression des Tumors führen (Fujisawa, 2000). Auch eine Metastasierung auf Grund eines Chemokingradienten wird beschrieben (Stewart and Smith, 2009). Insbesondere die ELR^+ -CXC-Chemokine werden hierfür verantwortlich gemacht.

Es wird versucht, sich die beschriebenen Effekte der Chemokine in Bezug auf die Entwicklung maligner Tumoren zu Nutze zu machen. So stellt beispielsweise die Blockade von Rezeptoren der Angiogenese fördernden Chemokine (CXCL4, 12) eine Möglichkeit dar

(Wang, 2006; Arya, 2007). Auf der anderen Seite können angiostatische Chemokine wie zum Beispiel CXCL10 genutzt werden um ein Tumorwachstum zu hemmen.

2.4 CXCL10

Ein Chemokin, das in der Karzinogenese eine zentrale Rolle spielt, ist CXCL10. Das 10kDa *interferon* (IFN- γ) *inducible protein* (CXCL10/IP10) wurde 1985 entdeckt (Luster 1985). Es ist ein Vertreter der ERL⁻-CXC-Chemokinfamilie mit einem Gewicht von ungefähr 10 kDa. CXCL10 wird, nach Stimulation, von verschiedenen Zellen, vor allem von Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten, sezerniert. Neben dieser Stimulation seiner Expression durch Entzündungsmediatoren (z. B. IFN- γ) wird das Protein in bestimmten Geweben auch konstitutiv exprimiert (Niere, Milz, Leber, Thymus, Lymphknoten).

CXCL10 entfaltet seine Wirkung durch Bindung an seinen Rezeptor CXCR3, welcher sich insbesondere auf Makrophagen, Dendritischen Zellen, NK-Zellen und aktivierten T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) befindet (Loetscher, 1996; Inngjerdigen, 2001; Kaplan, 1987; Boorsma, 1994; Gomez-Chiarri, 1993; Gattass, 1994). CD4⁺ T-Zellen können sich in zwei Subtypen differenzieren: die TH1-Zellen oder die TH2-Zellen. CXCL10 führt zu einer Aktivierung der TH1-Immunantwort (Bonecchi, 1998) und somit zu einer überwiegend proinflammatorischen Reaktion.

Der CXCR3-Rezeptor kann in drei Untergruppen geteilt werden, deren Aktivierung zu unterschiedlichen Effekten führt. Der klassische Rezeptor CXCR3A wird auf TH1-, CD8⁺ T-, B- und NK-Zellen gefunden und führt zu Chemotaxis oder Zellproliferation (Loetscher, 1998). CXCR3B wird in erster Linie auf Endothelzellen exprimiert und hat angiostatische Effekte (siehe oben). Chemotaktische Effekte zeigt die Aktivierung dieses Rezeptors jedoch nicht. Die genaue Funktion des Subtyps CXCR3-alt, dessen bekannter Ligand CXCL11 ist, konnte bisher nicht gezeigt werden. Er wird mit CXCR3A koexprimiert und zeigt keinen Effekt auf das Zellwachstum.

CXCL10 wirkt demnach chemotaktisch auf Zellen, welche den CXCR3A Rezeptor tragen. Dies kann zu einer Rekrutierung von Leukozyten in entzündliches oder auch maligne verändertes Gewebe führen. Darüber hinaus führt CXCL10 zu einer T-Zell-Adhäsion an Endothelien sowie zu einer Transmigration von Leukozyten.

Außer auf Leukozyten zeigt CXCL10 auch Wirkungen auf weitere Zellen wie z. B. Endothelzellen. Hier ist CXCL10 als ERL⁻-CXC-Chemokin ein potenter Inhibitor der Zellproliferation und, als Folge, der Angiogenese. Die Wirkung soll hier durch eine Hemmung der Interaktion zwischen VEGF und dem entsprechenden Rezeptor hervorgerufen werden (Strieter, 1995a; Strieter, 1995b; Luster, 1995; Angiolillo, 1995).

2.5 CX3CL1

Das Chemokin Fractalkine (CX3CL1) ist der einzige Vertreter der Gruppe der CX3C-Chemokine und stellt neben CXCL16 eine Ausnahme unter den Chemokinen dar, da es zunächst als Typ-1-Transmembrandomäne synthetisiert wird und erst durch Proteolyse an der Zellmembran in eine lösliche, chemotaktisch aktive Form überführt wird (Bazan, 1997; Pan, 1997). Bis zu seiner Entdeckung wurde angenommen, dass Chemokine ausschließlich in löslicher Form vorliegen und über Glucosaminoglykane mit der Zelloberfläche verbunden sind (Tanaka, 1993). CX3CL1 besteht aus einer extrazellulären, N-terminalen Chemokindomäne, einem an O-glykosylierten Serin- und Threoninresten reichen muzinähnlichen Stiel, einer membrandurchspannenden α -Helix sowie einer kurzen zytoplasmatischen C-terminalen Domäne. Die lösliche Form enthält lediglich die Chemokin- und einen Teil der muzinähnlichen Domäne (Mizoue, 1999; Fong, 2000).

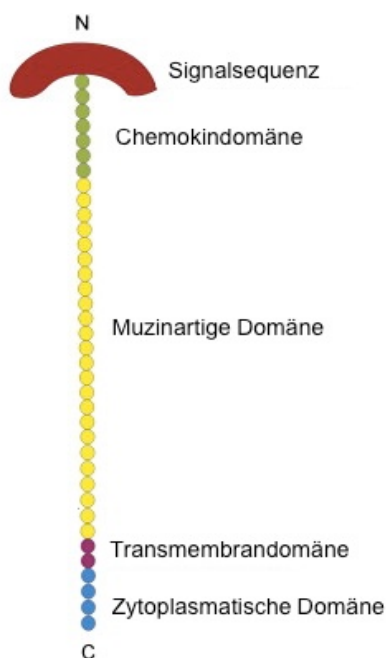


Abbildung 4: Struktur von CX3CL1. Links zu sehen ist der Aufbau der membrangebundenen Form, rechts der Aufbau des löslichen CX3CL1. Abbildung nach Liu, 2011.

Der entsprechende Rezeptor für das CX3CL1, CX3CR1, wird auf NK-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und Monozyten exprimiert (Imai, 1997; Combadière 1998). Auf Thrombozyten ist er ebenfalls nachzuweisen (Schäfer, 2004).

Wie unter 2.2 beschrieben, führen Chemokine zu einer G-Protein vermittelten Konformationsänderung der Integrine auf der Leukozytenoberfläche und somit zu ihrer festen Adhäsion am Endothel. Fractalkine ist dagegen in der Lage, auch ohne Anwesenheit

von Integrinen durch Interaktion mit seinem Rezeptor unter venösen Flussbedingungen als Adhäsionsmolekül zu fungieren. Hierfür verantwortlich ist sein muzinartiger Stiel (Imai, 1997; Fong, 1998; Fong, 2000). Zusätzlich kann die Adhäsion durch eine induzierte Konformationsänderung der Integrine verstärkt werden, sodass eine feste Adhäsion auch bei größeren Scherkräften möglich wird (Goda, 2000; Kerfoot, 2003).

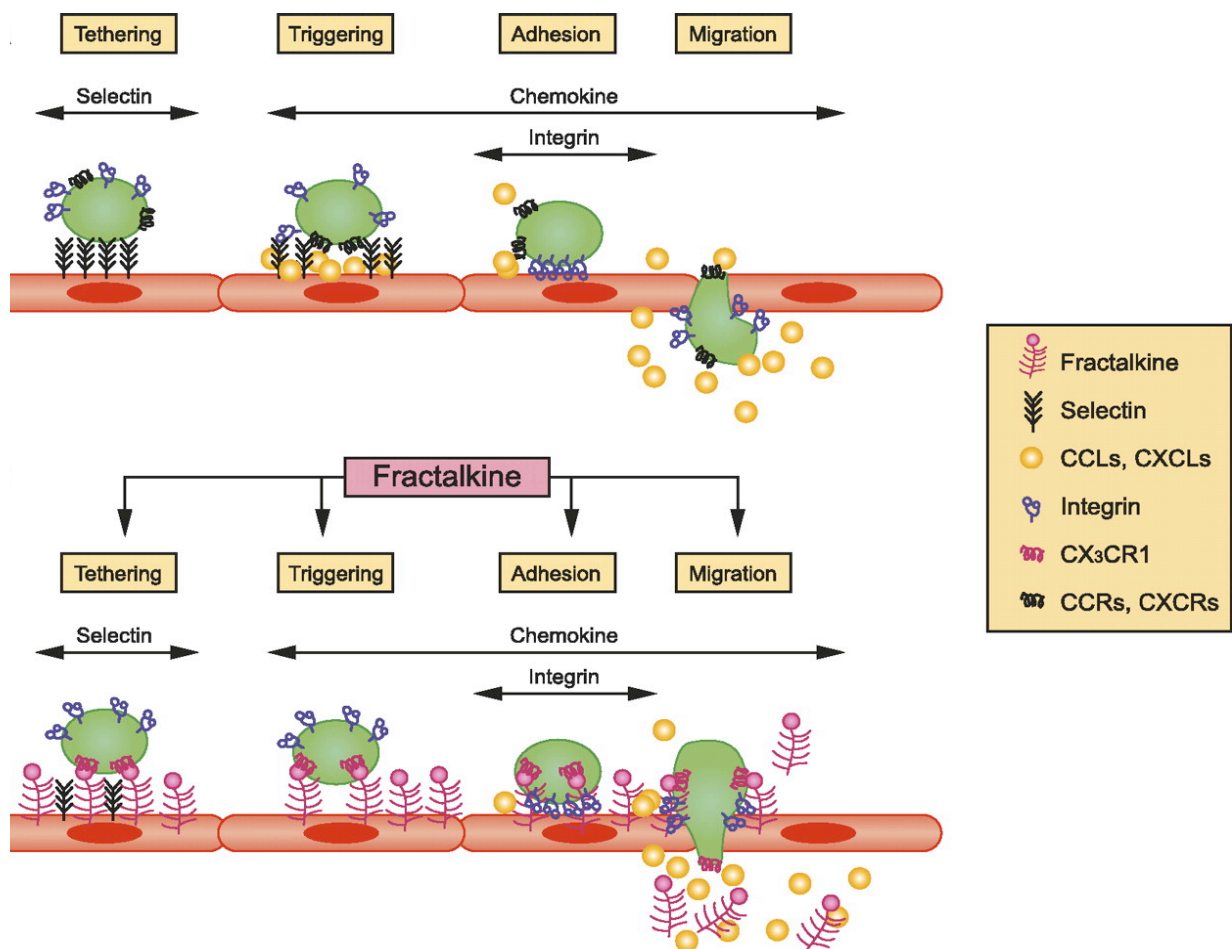


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Leukozytenmigration in klassischer Weise und Fractalkine vermittelt. Oben dargestellt ist der klassische schrittweise Weg: 1. Rollen der Leukozyten auf dem Endothel (Selektinvermittelt), 2. Aktivierung der Integrine auf Leukozyten durch Chemokine, 3. Feste Adhäsion der Leukozyten, 4. Transendotheliale Migration entlang des Chemokingradienten. Unten dargestellt ist der durch Fractalkine vermittelte Weg der Leukozyten durch das Endothel. Fractalkine wird auf dem Endothel membranverankert exprimiert und bindet die Leukozyten. Fractalkine kann über die Bindung an CX3CR1 auch zu einer Verstärkung der Integrinwirkung führen und so zu einer festeren Bindung der Leukozyten führen. Im letzten Schritt findet wie beim klassischen Weg die Transmigration statt. Abbildung nach Umehara, 2004.

In Studien wurde die Chemokindomäne des CX3CL1 durch das CC-Chemokin TARC (CCL17) ersetzt um die molekularen Zusammenhänge der Interaktion aufzuklären. An das

immobilisierte neue Konstrukt konnten nun ausschließlich Zellen binden, welche den TARC-Rezeptor (CCR4) trugen (Imai, 1997). Es ist also davon auszugehen, dass die Bindung von der Chemokindomäne und deren Interaktion mit dem jeweiligen Rezeptor abhängt.

2.6 Glykosylphosphatidylinositol verankerte Proteine

GPIs (Glykoinositolphospholipide) werden posttranslationell an Proteine gebunden und dienen diesen zur Verankerung in der Außenseite der Plasmazellmembran. Dieser Funktion wegen werden sie auch als GPI-Anker bezeichnet.

1976 und 1977 zeigten IKEZAWA und LOW unabhängig voneinander, dass man mit bakterieller PI-PLC (phosphatidylinositolspezifische Phospholipase C) das Enzym AP (Alkalische Phosphatase) von Plasmazellmembranen abspalten kann. PLC spaltet Phosphatidyl zwischen dem Glycerin Rückgrat und der Phosphatgruppe, woraus geschlossen wurde, dass die AP durch eine Art GPI-Anker verankert sein muss. Es wurde deutlich, dass diese Art von Verankerung nicht auf die AP beschränkt ist. Neben membrangebundenen Enzymen findet sie sich zum Beispiel bei Rezeptoren für die Urokinase (Ploug, 1991), zellulären Markern wie CD58 (Dustin, 1987) oder dem Folattransporter (Verma, 1992).

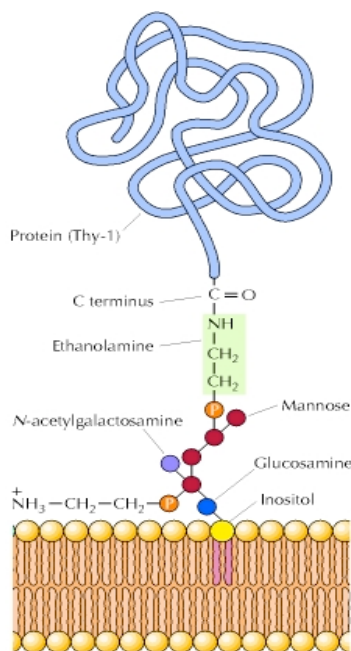


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Struktur eines GPI-Ankers. Das Protein ist am Carboxyterminus mit dem GPI-Anker verbunden. Dieser besteht aus einem Phosphoethanolamin-Rest, verschiedenen Kohlenhydratresten und einer Phosphatidylinositolkopfgruppe. Die Verankerung in der äußeren Schicht der Lipiddoppelmembran wird über hydrophobe Fettsäuren des Phospholipids gewährleistet. (Abbildung: The Cell; Cooper, 2000)

Die Struktur des GPI-Ankers wurde erstmals von Ferguson et al (1985) beschrieben. Er besteht aus einem Phosphoethanolamin-Rest, der über drei Mannose- und ein Glukosamin-Molekül glykosidisch mit Phosphatidylinositol verbunden ist. Die GPIs werden im ER (Endoplasmatisches Retikulum) produziert und an Proteine gebunden, welche eine spezifische C-terminale Signalsequenz besitzen. Anschließend werden sie im ER und Golgi glykosyliert und an die Zellmembranoberfläche transportiert (Medof, 1996).

GPI-Anker finden sich in konzentrierter Form in sogenannten *lipid rafts*, die Cholesterol und glykosphingolipidreiche Bereiche der Plasmamembran darstellen (Sangiorgio, 2004). Sie führen hier zu einer lateralen Beweglichkeit der durch sie verankerten Proteine.

Eine Besonderheit GPI verankerter Proteine ist, dass sie sich nach ihrer Extraktion aus der Membran in die Oberflächenmembran unterschiedlicher Gewebe reintegrieren können. Die Proteine besitzen dann die Fähigkeit, an definierter Stelle ihre Funktionen wiederaufzunehmen (Premkumar, 2001; Djafarzadeh, 2004). Indem die oben genannte C-terminale Signalsequenz eines verankerten Proteins (zum Beispiel des LFA-3), welche für die GPI-Verankerung eines Proteins verantwortlich ist, an ein beliebiges Protein gefügt wird, kann dieses in GPI-verankerter Form exprimiert und in Membranen integriert werden um dort seine ursprüngliche Funktion auszuüben. Dieser Vorgang wird auch als *cell surface engineering* bezeichnet und wird zum Beispiel bei der Entwicklung von Tumorstoffen ausgenutzt. MHC-I-Moleküle (Huang, 1994) sowie GPI-verankerte Zytokine (Li, 2004) wurden beispielsweise in GPI-verankerter Form hergestellt und auf Tumorzellen exprimiert.

3 Hintergrund und Zielsetzung

Chemokine vermitteln bei inflammatorischen Prozessen die Extravasation und Migration von immunkompetenten Zellen in das betroffene Gewebe. Die auf diese Weise angelockten Zellen produzieren wiederum Chemokine, wodurch sich ein selbstverstärkender Regelkreis entwickelt, der zur Elimination der Entzündungsursache führen soll. Daneben können diese Eigenschaften auch zu einer immunzellvermittelten Antwort gegen malignes Gewebe und zu seiner Zerstörung führen. Insbesondere die proinflammatorischen Chemokine, wie zum Beispiel CXCL10, führen durch Bindung an ihre Rezeptoren und einer folgenden Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen oder NK-Zellen zu den beschriebenen Effekten. Allerdings haben Tumoren Strategien entwickelt, um dieser Immunreaktion gegen sie auszuweichen. Diese Ausweichstrategien sind umso wirksamer, je schwächer die Immunreaktion gegen die entarteten Zellen ist. In der Krebstherapie werden bereits zytotoxische T-Zellen gegen Tumorantigene generiert, welche jedoch häufig nur in geringem Maße in die Umgebung des Tumors rekrutiert werden.

Die Idee der vorliegenden Arbeit war, die Chemokinkonzentration von CXCL10 gezielt in der Tumorumgebung zu erhöhen und somit die Rekrutierung von T-Lymphozyten und NK-Zellen zu verstärken. Dieses Ziel sollte durch Fusion der funktionellen Chemokindomäne mit einem GPI-Anker erreicht werden, welcher sich in Zellmembranen inkorporieren und somit die Präsentation des Chemokins auf der Zelloberfläche ermöglichen könnte. Ein örtlich begrenzter hoher Chemokingradient wäre die Folge einer Applikation dieses Proteins in die Umgebung des Tumors. Für die Extravasation der Leukozyten in das Gewebe des Tumors ist ihre Adhäsion am Gefäßendothel notwendig. Diese sollte durch eine an das CXCL10 gekoppelte muzinartige Domäne des Chemokins Fractalkine ermöglicht werden.

Das beschriebene Konstrukt war bereits durch Amplifikation der DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Sequenz von CXCL10 und der muzinartigen Domäne von Fractalkine aus cDNA-Proben generiert und mit einer GPI-Signalsequenz aus LFA-3 in einen Expressionsvektor kloniert worden. Auch ein Konstrukt ohne muzinartige Domäne war entwickelt worden. Nach Expression der Konstrukte in Zellen war versucht worden, sie proteinchemisch aufzureinigen. Hier war jedoch nur ein unzureichender Reinheitsgrad sowie lediglich eine geringe Konzentration der Proteine erreicht worden.

Aus den gegebenen Informationen und Voraussetzungen ergaben sich folgende Aufgabestellungen und Ziele im Rahmen der vorliegenden Dissertation:

- ♦ Klonierung der beschriebenen Fusionsproteine: Diese sollten aus CXCL10, der GPI-Signalsequenz aus LFA-3 und gegebenenfalls aus der muzinartigen Domäne von CX3CL1 bestehen. Um eine Aufreinigung der Proteine zu ermöglichen und zu verbessern, sollte eine c-mycTag-Sequenz eingefügt werden.
- ♦ Expression der Proteine in CHO-dhfr^(-/-)-Zellen: Die Präsentation der Proteine auf der Zelloberfläche sollte durchflusszytometrisch sowie fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden.
- ♦ Aufreinigung der Proteine mittels FPLC (engl. *fast protein liquid chromatography*): Hierfür mussten die Proteine aus der Zellmembran der CHO-dhfr^(-/-)-Zellen extrahiert werden. Die anschließende Aufreinigung sollte affinitätschromatographisch über den c-mycTag erfolgen.
- ♦ Reinkorporierung der Proteine in die Zellmembran mikrovaskulärer Endothelzellen: Die Präsentation auf der Zelloberfläche sollte durchflusszytometrisch bestätigt werden.
- ♦ Transfektion mikrovaskulärer Endothelzellen mit CXCL10-(mucin)-GPI: Hierdurch sollte, unabhängig von dem Ergebnis der Proteinaufreinigung, die Durchführung funktioneller Versuche ermöglicht werden.
- ♦ Adhäsionsversuche mit den generierten Chemokinkonstrukten: Die Rekrutierung von Leukozyten sollte durch Adhäsionsversuche unter kontinuierlichem Fluss überprüft werden. Die Endothelzellen sollten zuvor entweder mit den aufgereinigten Proteinen behandelt oder mit den Chemokinkonstrukten transfiziert werden.
- ♦ Messung der Proliferation von Endothelzellen, welche mit den Fusionsproteinen behandelt wurden: Insbesondere in Hinblick auf die hemmende Wirkung von CXCL10 auf die Angiogenese sollte diese Wirkung auch für die Fusionsproteine geprüft werden.
- ♦ Messung der Migration von murinen Milzzellen entlang eines Gradienten der Fusionsproteine.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Entwicklungsgerät für Röntgenfilme Curix 60	Agfa, Köln
Elektroporationsgerät Gene Pulser (Zellkultur)	BioRad, Hercules
ELISA-Lesegerät GENiosPlus	Tecan, Crailsheim
Fluorescence Activated Cell Scanner FACSCalibur	BD Biosciences, San Jose
Heizbad für die Zellkultur Typ 1003	GFL, Burgwedel
Heizblock/Schüttler Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Heizblock/Schüttler Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Inkubator für die Mikrobiologie Modell 500	Memmert, Schwabach
Inkubator für die Zellkultur	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Mikroskop für die Zellkultur Diavert	Leitz, Oberkochen
PCR-Gerät Speed Cycler	Analytik Jena, Jena
Qubit Fluorometer	Invitrogen, Carlsbad
Reagenzglasschüttler, beheizbar	Infors, Bottmingen
Schwarz/weiß-CCD-Camera	Horn Imaging, Aalen
Spritzenpumpe SP210WZ	WPI, Sarasota
Tischzentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Umkehrmikroskop	Leica, Wetzlar
Video-to-FireWire-Converter	Horn Imaging, Aalen
Zentrifuge MinifugeT für die Zellkultur	Heraeus, Hanau

4.1.2 Software

CellQuest (FACS-Aufnahme /-Analyse)	BD Biosciences, Bedford
Xfluor (ELISA-Aufnahme)	Tecan, Crailsheim
Unicorn 4.0 (FPLC-Steuerung)	Amersham Biosciences, Uppsala
IC Capture 2.0.0.293 (Aufnahme von Videos)	The imaging Source, Bremen
WinMDI (FACS-Analyse)	Joseph Trotter, Freeware

4.1.3 Chemikalien

Aqua ad injectabilia (Injektionswasser)	Braun, Melsungen
BD OptEIA Substrate Reagent A (für ELISA)	BD Biosciences, San Jose
BD OptEIA Substrate Reagent B (für ELISA)	BD Biosciences, San Jose
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-Propansulfonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Complete® Protease Inibitor cocktail tablets	Roche, Basel
Deoxycholat, Natrium-Salz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd, 37%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
MA Tra A Reagenz	PromoKine, Heidelberg
Methyl- α -D-Mannopyranosid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
n-Dodecyl- β -D-Maltosid, Ultrol Grade	Calbiochem, San Diego
n-Octylglykosid	Boehringer, Mannheim
n-Octyl- β -D-Glukopyranosid, Ultrol Grade	Calbiochem, San Diego
Triton X-100	Fluka Chemica, Buchs
Triton X-100H	Calbiochem, SanDiego, USA

4.1.4 Materialien für die Zellkultur

4.1.4.1 Medien

Dulbecco`s Modified Eagles`s Medium (D-MEM)	Invitrogen, Carlsbad
MEM alpha Medium	Invitrogen, Carlsbad
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Carlsbad
RPMI 1640 Medium, Phenol Rot frei	Invitrogen, Carlsbad
Endothelial Cell Growth Medium MV (ECGM-MV)	PromoCell, Heidelberg
Iscove`s Medified Dulbecco`s Medium (I-MDM)	Invitrogen, Karlsruhe
Einfriermedium Cryo SFM (Serumfrei)	Promocell, Heidelberg

Medienzusätze

dialysiertes fötales Rinderserum (dFCS)	PAN Biotech GmbH
fötales Rinderserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Penizillin-/ Streptomycin-Lösung, 100x (P/S)	PAA Laboratories, Pasching
Geneticindisulfat (G418)	Invitrogen, Carlsbad
HT-Supplement, 50x	Invitrogen, Carlsbad
Hepes 1 M	Invitrogen, Carlsbad

Sonstige Reagenzien

Accutase®	Chemicon, Temecula
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
EDTA (Versen) , 1% in PBS	Biochrom AG, Berlin
Posphate buffered saline (PBS), 1x	PAA, Pasching
Hank`s balanced salt solution (HBSS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau, 0,4% Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
0,5 mg/ml Trypsin und 0,22 mg/ml EDTA in PBS	PAA, Pasching

Puffer für Adhäsionsversuche

50 mM HEPES

in HBSS (pH 7,2)

0,5 % w/v BSA

1mM CaCl₂1mM MgCl₂**4.1.4.2 Zellen, Zelllinien und deren Kulturmedien**

Zelllinie (Wachstum)	Beschreibung	Herkunft	Medium	Zusätze
CHO (adhärent)	Ovarzellen, chinesischer Hamster	ATCC, USA	MEM alpha Medium	10 % dFCS, 1 % P/S-Lösung, bei nicht trans- fizierten Zellen 1x HT-Supplement
HMEC (adhärent)	immortalisierte mikrovaskuläre Endothelzelllinie	PromoCell, Heidelberg	D-MEM	10 % FCS, 1 % P/S-Lösung
HDBEC (adhärent)	Primäre humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	PromoCell, Heidelberg	ECGM- MV	mitgeliefertes Supplementgemisch, 1 % P/S-Lösung
THP-1 (Suspensionszellen)	Monozyten-Zelllinie, gewonnen aus einer akuten mono- zytischen Leukämie	ATCC, USA	RPMI 1640	5 % FCS, 1 % P/S-Lösung
Hut78 (Suspensionszellen)	T-Zelllinie, gewonnen aus einem kutanen T- Zelllymphom	ATCC, USA	RPMI 1640	10 % FCS, 1% P/S
YT (Suspensionszellen)	NK-Zelllinie, aus einem NK-Zell- Lymphom	ATCC, USA	IMDM	20 % FCS, 1 % NaPyruvat

4.1.5 Materialien für die Mikrobiologie

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> DH5α	supE44, ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1.

Für die Kultivierung von *E. coli* DH5α-Bakterien wurden die folgenden Medien verwendet:

Lysogeny broth (LB)-Medium	1 % Bacto-Trypton 0,5 % Hefeextrakt 85 mM NaCl 10 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O
CaCl ₂ -Lösung (sterilfiltriert, pH 7)	60 mM CaCl
Agar (3 %)	3 % Agar-Agar in H ₂ O, autoklaviert
Super optimal broth with glucose (SOC)-Medium	2 % Bacto-Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose
Einfrierlösung für Bakterien (in H ₂ O, autoklaviert)	132,3 mM KH ₂ PO ₄ 21 mM Natriumzitat 3,7 mM MgSO ₄ x7H ₂ O 68,1 mM (NH) ₂ SO ₄ 459,3 mM K ₂ HPO ₂ x3H ₂ O 35,2 % Glyzerin

4.1.6 Materialien für die Proteinchemie

Chromatographie

Anti-mycTag Gel	MBL, Japan
Äkta FPLC-System	Amersham Biosciences, Uppsala
Leere Glassäule Tricorn 5/50	GE Healthcare, Uppsala
Puffer und Lösungen	
myc- Äquilibrationpuffer	PBS, 0,025 % TritonX-H
myc-Waschpuffer	0,025 % Triton X-100H, 145 mM NaCl, in PBS (w/v)
myc-Elutionspuffer	0,01 M Glyzin in H ₂ O; pH 2,3
myc-Lagerungspuffer	0,1 % Natriumazid in PBS (w/v)

SDS-PAGE

Anodenpuffer, 10x in H ₂ O; pH 8,3	1 M Tris/HCL
Kathodenpuffer, 10x in H ₂ O; pH 8,3	1 M Tris/HCL 1 M Trizin 1 % SDS

Silberfärbung

Fixierbad	50 % Methanol 10 % Essigsäure 40 % Wasser
Inkubationslösung	12,65 mM Natriumthiosulfat 0,5 mM Natriumacetat 0,5 % Glutaraldehyd 30 % Ethanol
Silberlösung	0,1 % Silbernitrat

	0,06 % Formaldehyd
Entwicklungslösung	235,9 mM Natriumcarbonat
	0,03 % Formaldehyd
Stopplösung	800mM EDTA
In H ₂ O	

4.1.7 Reagenzienpakete

DuoSet human CXCL10 ELISA development kit	R&D Systems, Minneapolis
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Luciferase Assay Kit	Promega, Mannheim
QiaPrep Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QiaPrep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Quant-iT dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen, Carlsbad
Quant-iT dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen, Carlsbad
QuikChange site-directed mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, CA
RNase-freies DNase Set (50)	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden
WesternBreeze Chemiluminescent Immunodetection System	Invitrogen, Carlsbad

4.1.8 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Basel
Restriktionsenzyme: <i>NdeI</i> , <i>Sall</i> , <i>XbaI</i> , <i>NheI</i> , <i>BsaI</i>	NEB, Frankfurt
Pfx-DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt
Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC)	Invitrogen, Carlsbad
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad

T4-DNA-Ligase	NEB, Frankfurt
Taq-DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt

4.1.9 Vektoren

pIRES2eGFP	Invitrogen, Karlsbad
pUC19	Invitrogen, Karlsbad
pEF-dhfr	M.Mack, Universität Regensburg

4.1.10 Primer

Konstrukt	Oligonukleotide 5`-3`
CXCL10	Fw: -CTAAAAGATCTCCTGCTAGCGAACAGAAGCTGATCAGC-
Mutagenese	Rv: -GCTGATCAGCTTCTGTTCGCTAGCAGCAGGAGATCTTTAG-
CXCL10	Fw: -GAGGAACCTGAATTCCCAGTCTCAGCACC-
Amplifikation	Rv: -CCCCTCTGGTGCTAGCAGGAGATCTTTTAG-

4.1.11 Antikörper

Primäre Antikörper					
Epitop	Wirt	Typ	Isotyp	Hersteller/ Ort	Konj.
hCXCR1	Maus	monoklonal	IgG2a	BD Pharmingen, San Diego	
hCXCR2	Maus	monoklonal	IgG1	BD Pharmingen, San Diego	
hCXCR3	Maus	monoklonal	IgG1	BD Pharmingen, San Diego	
hCXCR4	Maus	monoklonal	IgG2a	BD Pharmingen, San Diego	
hCXCL10	Kaninchen	polyklonal	IgG	Abcam, Cambridge	
hCXCL10	Ziege	polyklonal	IgG	R&D Systems, Minneapolis	

c-myc	Maus		IgG1	selbst hergestellt	
F4/80	Ratte	monoklonal	IgG2a	BD Pharmingen, San Diego	PE
cd3+	Hamster	monoklonal	IgG1	BD Pharmingen, San Diego	PerCP
cd11c+	Hamster	monoklonal	IgG1	BD Pharmingen, San Diego	APC
NK1.1	Maus	monoklonal	IgG2a	BD Pharmingen, San Diego	FITC
Isotyp-Kontrollen					
--	Kaninchen		IgG	Jackson ImmunoResearch, Newmarket	
--	Maus		IgG2a	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
--	Maus		IgG1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
--	Maus		IgG2b	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Sekundäre Antikörper					
Kaninchen IgG	Ziege	polyklonal		Jackson ImmunoResearch, Newmarket	PE
Ziege IgG	Esel	polyklonal		Acris, Heidelberg	PE
Maus IgG	Kaninchen	polyklonal		Dako Cytomation, Glostrup	PE

4.1.12 Proteine

rekombinantes humanes IL1 β (rhIL1 β)	Peprtech, Rocky Hill
BSA, Fraktion V	PAA, Pasching

rekombinantes humanes CXCL8 (rhCXCL8)	Peptotech, Rocky Hill
rekombinantes humanes CXCL8 (rhCXCL8)	Serono, Genf
rekombinantes humanes CXCL10 (rhCXCL10)	R&D Systems, Minneapolis

4.1.13 Größenstandards

SeeBlue Plus 2 (Silberfärbung)	Invitrogen, Carlsbad
MagicMark XP (Western Blot)	Invitrogen, Carlsbad
1 kb DNA Ladder (DNA-Agarosegele)	Invitrogen, Carlsbad

4.1.14 Sonstige Materialien

Elektroporationsküvetten, Elektrodenabstand 4mm	Peglab, Erlangen
FACS-Analysen_Röhrchen, 5 ml, Rundboden	BD Biosciences, Bedford
Flachboden-Mikrotiterplatte, 96-Loch	Costar, Corning
Magnetplatte 8x13 cm	PromoKine, Heidelberg
Millex GV Filter, 0,2 µm Porengröße (für Spritzen)	Millipore, Billerica
µ-slide I ^{0,4} Luer	Ibidi, Martinsried
Neubauer-Zählkammer	Merck, Darmstadt
PVDF Membrane filter paper sandwich	Invitrogen, Carlsbad
Röntgenfilme Kodak BioMax XAR	Kodak, Stuttgart
Rundboden-Mikrotiterplatte, 96-Loch	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Stericup GP Express Plus (50 ml Sterilfilter)	Millipore, Billerica
Transwell Porengröße 0,3 µm	Costar, Corning

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Restriktionsverdau von DNA

Für die Spaltung von DNA-Strängen wurde ein Reaktionsgemisch aus DNA, Restriktionsenzym (1 U/1 µg DNA/h), 10x Puffer sowie Injektionswasser hergestellt. Der Puffer und die Inkubationstemperatur wurden nach den Empfehlungen des Herstellers für das jeweilige Enzym gewählt.

4.2.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Bezogen auf die Zahl der Basenpaare wurden für die Ligation Verhältnisse von Vektor- zu Insert-DNA von 1:3 bis 1:10 eingesetzt, wobei ein Teil dabei 60 ng entsprach. Die Reaktionen wurden in Ansätzen mit mindestens 20 µl Gesamtvolumen durchgeführt, in denen die T4-DNA-Ligase (50 Units/ml) in 20x Verdünnung und der entsprechende Puffer in 10x Verdünnung verwendet wurden. Das fehlende Volumen wurde mit Injektionswasser aufgefüllt und die Ansätze anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

4.2.3 Transformation von *E.coli* DH5α

Für die Transformation von Ligationsansätzen wurden 500 ng DNA eingesetzt, für die Transformation von reiner Plasmid DNA nur 75 ng. Die entsprechende DNA-Menge, verdünnt in Injektionswasser, wurde zu 100 µl kalter Suspension elektrokompenter *E. coli* DH5α-Bakterien in 10 % Glycerin gegeben. Diese wurden anschließend nacheinander 10 min auf Eis und 2 min bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB Medium folgte eine weitere Inkubation der Bakterien für 1 h auf dem Heizschüttler bei 37 °C. Nach dieser Zeit wurde die gesamte Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten ausplattiert, die das zur Selektion positiver Klone nötige Antibiotikum (50 µg/ml für Ampizillin, 30 µg/ml für Kanamycin) enthielten und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.2.4 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* DH5α

Die Präparation von Plasmid-DNA aus transformierten *E.coli* DH5α-Bakterien erfolgte mit kommerziell erhältlichen Reagenzienpaketen und nach den Vorgaben des Herstellers. Für analytische Restriktionsverdau wurden die Plasmide mit dem Endofree Plasmid Mini Kit präpariert. Für die Gewinnung von Plasmiden wurde das Endofree Plasmid Maxi Kit benutzt.

4.2.5 Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

DNA-Fragmente wurden zur Charakterisierung oder Präparation in Agarosegelen (Agarosekonzentration: 0,6 %-2 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Alle Gele wurden dabei mit 0,5x TBE-Puffer angesetzt, mit 2 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Gel­flüssigkeit versetzt und nach einmaligem Aufkochen in Gelkammern gegossen. Zum Auftragen wurden die Proben mit einem entsprechenden Volumen von 6x Auftragspuffer (Endkonzentration 1x) versetzt. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE, versetzt mit 2 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Puffer, verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V. Anschließend wurden die Gele zur Dokumentation unter UV-Licht fotografiert bzw. die entsprechenden Banden aus den Gelen ausgeschnitten.

4.2.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde ein kommerziell erhältliches Reagenzienpaket verwendet (Qiaquick Gel Extraction Kit). Die Vorgehensweise entsprach den Vorgaben des Herstellers.

4.2.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur selektiven Anreicherung definierter Nukleinsäuresequenzen in Gemischen aus cDNA, genomischer DNA und Plasmid-DNA. DNA-Polymerasen polymerisieren hierbei einen Einzelstrang zum Doppelstrang, sofern ihnen ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht.

Die PCR kann automatisiert in programmierbaren Thermoblöcken durchgeführt werden, wobei der Prozess der Denaturierung in Zyklen von folgenden Schritten wiederholt wird: 1. Denaturierung des DNA- Doppelstranges, 2. spezifische Hybridisierung der Primer an die homologe Zielsequenz auf der DNA und 3. von den Primern ausgehende DNA-Synthese. Das so synthetisierte DNA-Fragment kann in der darauffolgenden Amplifikationsrunde als Matrice für den anderen Primer dienen.

Dadurch ist in mehreren aufeinander folgenden Zyklen eine exponentielle Anreicherung einer beliebigen DNA-Sequenz, die zwischen den beiden Primern liegt, möglich.

Die Anlagerungstemperatur für die Primer wurde immer 5 °C unter deren Schmelztemperatur (T_m) gewählt. Die Konzentrationen der Primer sowie der Deoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) richteten sich nach den Empfehlungen der Hersteller der verwendeten Polymerasen. Nach dem Ende der Reaktion wurden die Proben entweder direkt

weiterverarbeitet oder bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die folgende Tabelle fasst die verwendeten Programme und die Konzentrationen der Bestandteile der Ansätze zusammen.

	CXCL10		
	Reaktionsansatz	Programm	
DNA	6,6 ng/µl	Denaturierung	95 °C, 5min
SpeedampPuffer (Nr 3)	1x	Denaturierung	95 °C, 4sec
dNTPs (12,5mM)	0,25 mM	Hybridisierung	57 °C, 4 sec
Vorwärts Primer	0,3 µM	Elongation	72 °C, 20 sec
Rückwärts Primer	0,3 µM	Anzahl der Zyklen	35
Taq Polymerase	0,15 µl	Elongation	72 °C, 50 sec
H ₂ O ad inj.	ad 15 µl	Verwendeter Cycler	Speed cycler

Um bestimmte Mutationen in Plasmiden herbeizuführen, wurde das Quickchange Kit verwendet. Die Primer wurden nach Herstellerangaben entwickelt. Ebenso wurde bei der Durchführung der PCR nach Herstellerangaben vorgegangen.

4.2.8 RNA-Isolation

Die RNA wurde mittels des kommerziell erhältlichen Reagenzienpakets RNeasy Mini Kit nach den Vorgaben des Herstellers isoliert. Dabei wurde gleichzeitig die DNA mittels des kompatiblen DNase-Sets degradiert. Am Ende der Prozedur wurde die RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

4.2.9 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Bestimmung der Konzentrationen von DNA oder RNA erfolgte mit dem Quant iT Assay Kit von Invitrogen. Die Vorgehensweise entsprach den Vorgaben des Herstellers.

4.2.10 Reverse Transkription

Um über eine PCR amplifiziert werden zu können, musste die RNA revers transkribiert werden und in einen cDNA (*copy*-DNA)-Einzelstrang umgeschrieben werden. Hierzu wurde

ein Reaktionsansatz von 40 µl verwendet, der sich aus folgenden Reagenzien in der Endkonzentration zusammensetzte:

Substanz/Lösung	Endkonzentration
RNA	2 µg
First Strand Buffer (5x)	1x
DTT	13,4 mM
dNTP	0,5 mM
RNAse out	2,5 U/µl
Acrylamid	0,19 µg/ml
Hexamernukleotide	21,5 µg/ml
Reverse Transkriptase	72 U im RT ⁺ Ansatz
RNAse freies Wasser	Ad 40 µl

Als Negativkontrolle diente ein RT⁻Ansatz, welcher sämtliche oben genannten Reagenzien in 1:10 Verdünnung enthielt. An Stelle der Reversen Transkriptase wurde hier RNAse freies Wasser verwendet.

4.2.11 Klonierung von Chemokinkonstrukten

4.2.11.1 Klonierung des CXCL10-mycTag-GPI Konstruktes

Für die Klonierung von CXCL10-mycTag-GPI wurde zunächst CXCL10 mittels PCR (siehe 3.2.7) amplifiziert. Hierfür wurden ein vorhandenes Plasmid (pUC19-CXCL10-GPI) sowie die unter 3.1.11 angegebenen Primer verwendet. Die amplifizierte DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* sowie *NheI* geschnitten und anschließend in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt, aus welchem die entsprechende Bande geschnitten und die DNA extrahiert wurde.

Für die anschließende Klonierung stand ein pUC19-Vektor zur Verfügung, in welchen vorher bereits die Gene für Rantes, die GPI-Signalsequenz sowie ein Doppel-mycTag kloniert worden waren. Das Rantes-Gen wurde aus diesem Vektor durch einen Verdau mit *EcoRI* und *XbaI* herausgeschnitten und durch eine Agarosegelelektrophorese von dem Vektor getrennt. In den anschließend aufgereinigten Vektor konnte das mit *EcoRI* und *NheI*

geschnittene und im Agarosegel gereinigte CXCL10-Amplikon eingefügt werden. Das auf diese Weise entstandene CXCL10-mycTag-GPI-Konstrukt wurde dann in einen pEFdhfr-Vektor kloniert, indem sowohl das Konstrukt mit den Enzymen *EcoRI* und *SaII* aus seinem Vektor geschnitten als auch ein pEF-dhfr-Vektor mit diesen Enzymen geöffnet wurde. Nach Aufreinigung und Ligation sollte das Konstrukt in CHO-dhfr^(-/-)-Zellen exprimiert werden. Dazu wurde zunächst *E. coli* DH5α mit dem Plasmid transformiert und positive Klone über Ampizillin-Resistenz selektiert. Verschiedene Klone wurden vermehrt und die Plasmid-DNA isoliert. Durch einen analytischen Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *SaII* wurden solche Plasmide identifiziert, die das erwartete Restriktionsmuster zeigten. Einer der so identifizierten positiven Klone wurde wiederum vermehrt, die Plasmid-DNA isoliert und nach einer erneuten Sequenzierung mittels eines Verdau mit *NdeI* linearisiert und in CHO-dhfr^(-/-)-Zellen transfiziert. Diese Zellen exprimieren keine Dihydrofolat-Reduktase, ein Schlüsselenzym des Thymin-Biosynthese-Wegs. Daher können sie nur in Medium wachsen, dem von außen Nukleotide zugesetzt wurden (in Form von DNA-Supplement, einer Mischung aus Hypoxanthin und Thymidin). Diese Tatsache konnte zur Selektion ausgenutzt werden, da der pEF-dhfr-Vektor das Gen für die Dihydrofolat-Reduktase trägt. Indem die transfizierten Zellen in Medium ohne Nukleotide inkubiert wurden, konnten nur solche Zellen überleben, die die Vektor-DNA aufgenommen hatten und auch die darauf befindlichen Gene exprimierten.

4.2.11.2 Klonierung des CXCL10-muzin-mycTag-GPI-Konstruktes

Für die Klonierung von CXCL10-muzin-mycTag-GPI musste zunächst ein Primer entwickelt werden, um in dem oben beschriebenen CXCL10-mycTag-GPI Konstrukt die *NheI/XbaI*-Restriktionsstelle zwischen CXCL10 und dem mycTag in eine reine *NheI*-Schnittstelle zu mutieren, da es Restriktionsenzymen nicht möglich ist, eine *NheI/XbaI*- Restriktionstelle zu schneiden. Der Grund hierfür liegt wie dargestellt in den von Restriktionsenzymen unerkennbaren unterschiedlichen Basen, welche an die übereinstimmenden überhängenden Enden grenzen.

-G CTAGA-

-CGATC T-

Die Primer wurden mit Hilfe des Programms QuikChange Primer Design von Stratagene *designed*. Da sich die vorhandene *XbaI/NheI* Schnittstelle (Basensequenz: GCTAGA) und die gewünschte *NheI* Schnittstelle (Basensequenz: GCTAGC) in lediglich einer Base unterscheiden, war eine Punktmutation nötig.

Anschließend erfolgte die Mutagenese PCR mit dem QuikChange Site directed mutagenesis Kit nach dem entsprechenden Protokoll.

Die nun erhaltene *Nhe1*-Schnittstelle ermöglichte es, die CXCL10-Gensequenz aus dem vorhandenen Konstrukt mit den Restriktionsenzymen *EcoR1* und *Nhe1* zu schneiden und anschließend wie oben beschrieben aus einem Agarosegel (2 %) zu extrahieren. Für die anschließende Klonierung stand ein pEF-dhfr-Vektor zur Verfügung, in den vorher bereits die Gene für SDF1, die Sequenz für die Muzindomäne von CXCL1, die GPI-Signalsequenz sowie ein c-mycTag kloniert worden waren. Das SDF1-Gen wurde aus diesem Vektor durch einen Verdau mit *EcoR1* und *XbaI* herausgeschnitten und durch eine Agarosegelelektrophorese von dem Vektor getrennt. In den anschließend aufgereinigten Vektor konnte das mit *EcoRI* und *NheI* geschnittene und im Agarosegel gereinigte CXCL10-Amplikon eingefügt werden. Die weitere Vorgehensweise entsprach der unter 3.2.11.1 beschriebenen.

4.2.11.3 Subklonierung von CXCL10-(mucin)-GPI in den pIRES2-eGFP Vektor

Um die Detektion des CXCL10-(mucin)-GPI zu vereinfachen, wurde eine Subklonierung in den pIRES2-eGFP Vektor durchgeführt. Dieses Plasmid besitzt eine interne Bindungsstelle für Ribosomen IRES (engl. *internal ribosomal entry site*) und ermöglicht die gemeinsame Transkription bei getrennter Translation von zwei Genen. Auf diese Weise kann von einem 1:1 Verhältnis zwischen den beiden abgelesenen Genen ausgegangen werden. Da der pIRES2-eGFP Vektor bereits das Gen für das Markerprotein eGFP enthält, lässt dieses Rückschlüsse auf die Expression des zweiten Gens CXCL10-(mucin)-GPI zu. Für die Subklonierung wurden die CXCL10-(mucin)-GPI kodierenden Gensequenzen durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *EcoRI* und *SalI* aus dem pEF-dhfr-Vektor herausgeschnitten und nach Aufreinigung in den ebenfalls mit diesen Enzymen verdauten Vektor pIRES2-eGFP ligiert. Die weitere Vorgehensweise entsprach der unter 3.2.11.1 beschriebenen.

4.3 Zellulär-immunologische Methoden

4.3.1 Zellkultur

4.3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 % igen CO₂-Luftgemisch. Um Kontaminationen zu vermeiden wurden sämtliche Experimente und Manipulationen mit Zellen ausschließlich unter sterilen

Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt. Sämtliche Zellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Zelluntergang und mikrobielle Verunreinigung inspiziert. Mögliche Kontaminationen mit Mykoplasmen wurden ausgeschlossen.

4.3.1.2 Einfrieren und Auftauen lebender Zellen

Die Zellen wurden vor dem Einfrieren im jeweiligen Medium mit 10 % DMSO als Cryoprotektans suspendiert und in einem Isopropanol-Behälter über 24 h auf -80 °C gekühlt. Die weitere Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -180 °C.

Nach dem zügigen Auftauen der Zellen wurden sie vor ihrer Kultivierung zentrifugiert um das DMSO zu entfernen.

4.3.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Der Trypanblauausschlusstest wurde zur Bestimmung der Lebendzellzahl durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus, tote Zellen werden blau angefärbt.

Zellzahlen wurden durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

4.3.1.4 Kultivierung von Zelllinien

Das Medium der adhärenenten Zellen (HMEC, HDBEC, CHO^(-/-)) wurde, dem Zellwachstum entsprechend, alle 2-3 Tage gewechselt. Zum Splitten bei etwa 90 % iger Konfluenz wurden diese Zellen mit PBS gewaschen, mittels Inkubation in EDTA-Lösung (1,5 mM EDTA in PBS, 0,1 ml/cm²) abgelöst, für 3 min bei 220 g zentrifugiert und in entsprechender Verdünnung neu ausgesäht.

Die Suspensionszellen (THP-1, HUT78, YT) wurden in entsprechendem Medium bis zu einer Dichte von $1,3 \times 10^5$ Zellen pro ml kultiviert, wobei das Medium alle drei bis vier Tage durch Abzentrifugieren und Resuspendieren der Zellen in frischem Medium gewechselt wurde. Bei einer ausreichenden Dichte wurden die Zellen durch Verdünnen der Zellsuspension in frischem Medium gesplittet.

4.3.1.5 Ernten von transfizierten Zellen

Für die Gewinnung von Protein aus transfizierten CHO-dhfr^(-/-)-Zellen wurden diese auf zwölf 150 cm²-Kulturflaschen verteilt und bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Zur Ernte der Zellen wurden sie nach dem Waschen mit PBS durch EDTA-Lösung (s.o.) abgelöst, abzentrifugiert (s.o.) und ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Auf diese Weise ließen sich

für die Proteinisolation etwa $3,6 \times 10^8$ Zellen gewinnen. Das Zellpellet wurde bis zur Extraktion bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Für die Proteinisolation (s.4.4.1) wurde das Zellpellet in 5 ml hypotonem Lysepuffer mittels einer Spritze 10x resuspendiert. Im Anschluss an die hierdurch herbeigeführte Zerstörung der Zellen wurden die Zellbestandteile abzentrifugiert. Nach Inkubation (1 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) in 7 ml Extraktionspuffer, welcher n-Dodecyl-b-D-Maltosid enthielt, wurden die Zellbestandteile wiederum abzentrifugiert ($16.000\times g$, 20 min) und über einen Filter ($0,2\text{ }\mu\text{m}$ Porengröße) von den extrahierten Proteinen getrennt.

4.3.2 Stabile Transfektion von Eukaryotenzellen

Bei der stabilen Transfektion eukaryoter Zellen wird das gewünschte Konstrukt in die chromosomale DNA eingebaut. Dies wird in der Regel durch homologe oder nicht-homologe Rekombination erreicht. Die Isolation stabil transfizierter Klone sowie die Aufrechterhaltung der Fremd-DNA im Genom erfordern das Vorhandensein von Selektionsgenen im Vektor, welche eine Resistenz gegen bestimmte Antibiotika verleihen. Um den Einbau der DNA in das Genom zu fördern werden die Plasmide vor der Transfektion linearisiert.

Um die CXCL10-Konstrukte stabil in CHO-dhfr^(-/-) zu exprimieren, wurden die Plasmide zunächst durch einen Restriktionsverdau mit *NdeI* (für pEF-dhfr) linearisiert. Die zu transfizierenden Zellen waren am Tag der Transfektion 80 %-90 % konfluent. Sie wurden dann mit 1,5 mM EDTA in PBS ($0,1\text{ ml/cm}^2$) abgelöst, für 3 min bei $220\times g$ zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. 1×10^7 Zellen pro Transfektionsansatz wurden in $400\text{ }\mu\text{l}$ PBS aufgenommen und $30\text{ }\mu\text{g}$ der linearisierten Vektor-DNA in $90\text{ }\mu\text{l}$ Injektionswasser zugegeben. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen in der Suspension bei $960\text{ }\mu\text{F}$ und 260 V elektroporiert und danach erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen mit entsprechendem Kulturmedium in eine Zellkulturflasche gegeben und für 24 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert. Nach 24 h wurde das Kulturmedium durch entsprechendes Selektionsmedium ersetzt.

4.3.3 Durchflusszytometrie (FACS)

4.3.3.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Bei der Durchflusszytometrie mit einem *Fluorescence-activated cell sorter* (FACS) werden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen Oberflächenantigene markiert und das durch Laserstrahl hervorgerufene Streulicht und Fluoreszenzmuster analysiert.

4.3.3.2 Durchflusszytometrie zur Bestimmung von Oberflächenmolekülen

Für die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) wurden pro Ansatz 1×10^5 Zellen nach Ablösen mit EDTA (siehe oben) in ein Loch einer 96-Loch-Platte pipettiert, einmal mit 100 µl PBS gewaschen und zentrifugiert (220 g, 4 °C, 2 min). Nun erfolgte eine Inkubation der Zellen mit dem Antikörper gegen das gesuchte Oberflächenmolekül in 100 µl FCS freiem Medium für 45 min auf Eis. Die Endkonzentration des verwendeten Antikörpers oder der entsprechenden Isotypkontrollen betrug 10 µg/ml (Antikörper gerichtet gegen mycTag, CXCL10). Anschließend wurden die Zellen wiederum gewaschen und 30 min mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten Phycoerythrin-(PE)-konjugierten Antikörper (Konzentration 10 µg/ml), welcher in FCS freiem Medium aufgenommen wurde, im Dunkeln auf Eis inkubiert. Im Falle der Verwendung der Antikörper gegen CD3⁺, CD11c⁺, F4/80 oder NK1.1 entfiel die Inkubation mit einem Sekundärantikörper, da diese Antikörper bereits mit dem Detektionssystem gekoppelt vorlagen. Vor der durchflusszytometrischen Messung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 150 µl PBS in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Messung der Fluoreszenzintensität der Zellen und die entsprechende Auswertung erfolgten am FACSCalibur und mit der unter 3.1.2 genannten Software. Für jeden Antikörper wurde ein passender IgG-Isotyp im Kontrollansatz verwendet.

4.3.3.3 Nachweis der Reinkorporierung von aufgereinigten Chemokin-Konstrukten in die Zellmembran

Um zu untersuchen, ob sich die exogen zugegebenen Chemokin-Konstrukte in die Zellmembran reinkorporieren, wurden 4×10^6 der zu untersuchenden Zellen in 200 µl FCS-freiem Medium aufgenommen und je 50 µl in ein Loch einer 96-Loch-Platte verteilt. Anschließend wurden zu je zwei der Ansätze 50 µl TSK-Säulen-Puffer und 50 µl der TSK-Säulen-Fraktion mit der höchsten CXCL10-(muzin)-mycTag-GPI-Konzentration gegeben. Anschließend wurden alle Proben für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen, anschließend gefärbt und mittels FACS analysiert, wobei je einer der Doppelansätze als Isotypkontrolle diente und der andere mit dem Antikörper gegen den mycTag gefärbt wurde.

4.3.3.4 Nachweis der GPI-Verankerung der CXCL10-GPI- und CXCL10-muzin-GPI-Konstrukte

Der GPI-Anker kann durch das Enzym Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) zwischen dem Phosphatrest des Phosphatidylinositol und dem Diglyceridrest mit den beiden Fettsäuren gespalten werden. Dies führt zu einer Freisetzung der an den GPI-Anker

gebundenen Proteine von der Zellmembran und kann somit einem GPI-Verankerungsbeweis dienen.

Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde je einer der Doppelansätze in 200 µl PBS mit 120 ng/ml PI-PLC resuspendiert, die anderen zwei Ansätze wurden als Negativkontrolle in reinem PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach dieser Zeit wurden alle Ansätze einmal mit kaltem PBS gewaschen und danach wie oben beschrieben gefärbt und mittels FACS analysiert.

4.3.3.5 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung

Die Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung kann eingesetzt werden, um definierte Subpopulationen in Zellgemischen voneinander zu trennen. Durch das FACS können Zellen anhand ihrer Größe, Granularität oder durch Fluoreszenzmarkierung voneinander unterschieden werden. Die Zellsuspension wird in kleine Tropfen zerlegt, so dass ein Tropfen höchstens eine Zelle beinhaltet. Diese durchlaufen dann nacheinander einen Laserstrahl, welcher die Zellen anregt. Bei Vorhandensein einer Emission durch eine fluoreszierende Zelle erhält diese eine elektrische Ladung. Die Tropfen werden anschließend aufgrund dieser Ladung in einem elektromagnetischen Feld getrennt und in Röhrchen gesammelt. Schwierigkeiten bei dieser Methode sind die hohe Mortalitätsrate empfindlicher Zellen sowie die Möglichkeit der Kontamination.

Die Methode wurde angewandt, um CXCL10-mycTag-GPI positive CHO-dhfr^(-/-)-Zellen von den nicht stabil transfizierten Zellen zu trennen. Die Vorbereitung der Zellen entsprach der einer durchflusszytometrischen Untersuchung von Oberflächenmolekülen (siehe 4.3.3.2). Von den eingesetzten 2×10^6 Zellen konnten 2×10^5 positive Zellen isoliert werden. Diese wurden in einem Medium mit Penicillin und Streptomycin (P/S) kultiviert und nach mehrmaligen Teilungen erneut durchflusszytometrisch untersucht.

4.3.4 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus entnommenen Milzen

Zur Isolation von Splenozyten wurden die Milzen zunächst mechanisch zerkleinert und anschließend die Zellen mit Hilfe eines 40 µm Zellsiebs vereinzelt. Nach Abzentrifugieren der Zellen (400 g, 4 °C, 7 min) und Abkippen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5-10 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte das Auffüllen des 50 ml Falcons mit PBS und erneutes Abzentrifugieren. Meistens musste der Lyseschritt im Anschluss noch einmal wiederholt werden, um eine vollständige Lyse der noch verbliebenen Erythrozyten zu erzielen. Das auf diese Weise gewonnene

Zellpellet wurde dann mit Medium auf die gewünschte Konzentration gebracht ($20 \times 10^6/\text{ml}$) und in Kultur genommen.

Bei der *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)-Isolationsmethode werden Zellen mit Antikörpern markiert, welche an paramagnetische Mikropartikel gekoppelt sind. Die Zellen wurden für 15 min in einem speziellen MACS-Puffer bei 4 °C mit den Microbeads markiert, anschließend gewaschen und in MACS Puffer resuspendiert. Im Folgenden wurde die markierte Zellsuspension auf eine Trennsäule mit einer paramagnetischen Matrix gegeben. Alle mit Microbeads beladenen Zellen wurden durch Einbringen der Säule in das Magnetfeld eines starken Permanentmagneten in der Matrix zurückgehalten. Alle unmarkierten Zellen wurden durch mehrmaliges Spülen mit MACS-Puffer aus der Säule entfernt, so dass nur die gewünschte Zellpopulation in der Säule zurückgehalten wurde. Anschließend ließ sich die markierte Zellpopulation aus der Säule eluieren.

Zur Aufreinigung nach der MACS-Methode wurden Reagenziensätze der Firma Miltenyi Biotec nach dem entsprechenden Hersteller-Protokoll verwendet.

4.4 Proteinchemische Methoden

4.4.1 Säulenchromatographie

Um das GPI verankerte CXCL10 (-mucin) zu reinigen, wurde die Methode der Säulenchromatographie an einem FPLC-System angewandt. Sämtliche Parameter wurden mit Hilfe der Software *Unicorn* aufgezeichnet und graphisch dargestellt. Alle für die Säulenchromatographie verwendeten Materialien enthielten pyrogenfreie Bestandteile um das Risiko einer Kontamination zu minimieren.

Um die Aufreinigung der Proteine zu erleichtern und schonender zu gestalten wurde ein Doppel-mycTag in die zu isolierenden Konstrukte eingefügt. Durch diesen konnte eine Bindung an einen mycTag spezifischen Antikörper gewährleistet werden, welcher zuvor an das Säulenmaterial gebunden wurde. Die Elution erfolgte durch kompetitive Bindung von Peptiden an den mycTag spezifischen Antikörper, wodurch die Notwendigkeit eines sehr hohen oder sehr niedrigen pH-Wertes im Rahmen der Elution umgangen wurde. Da die Proteine, welche gereinigt werden sollen, durch den GPI-Anker lipophilen Charakter erhalten, war es nötig, sie durch ein Detergens als Pufferzusatz in Lösung zu halten und somit eine Aggregation zu verhindern. Verwendet wurde hier ausschließlich Triton X-100H, welches den Vorteil fehlender Eigenabsorption von UV-Licht besitzt. Die Säulen konnten bis zu 10x, jedoch ausschließlich für die Aufreinigung eines Proteins verwendet werden.

Gelagert wurde die Säule in NaN_3 (0,1 %). Dieses wurde vor Verwendung der Säule für die Proteinaufreinigung mittels PBS ausgewaschen. Anschließend folgte die Äquilibration der Säule mit 5 Säurevolumina (CV) Puffer. Das vorbereitete Proteinextrakt wurde langsam (0,01 ml/min) auf die Säule geladen. Die Entfernung ungebundener Proteine erfolgte durch nachfolgendes Auftragen des Waschpuffers (5 CV). Um das Salz des Waschpuffers zu entfernen, folgte eine Spülung der Säule mit dem Äquilibrationpuffer.

Für die Elution des Proteins wurden 5ml des Elutionspuffers bestehend aus dem myc-Peptid aufgetragen (0,01 mg/ml), welches an den mycTag spezifischen Antikörper der Säule bindet und das zu eluierende Protein verdrängt. Anschließend wurde die Säule mit PBS gespült und wiederum in NaN_3 (0,1 %) gelagert.

4.4.2 SDS-PAGE

Proteine wurden nach ihrem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamid Gel Electrophoresis*) nach Laemmli (1979) aufgetrennt. Hierbei lagern sich Dodecylsulfatanionen proportional an die Proteine (1 SDS Molekül pro 2 Aminosäurereste). Gleichzeitig werden die Proteine vollständig denaturiert und können daher im Gel entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden, indem die negativen geladenen Proteine im elektrischen Feld zur Anode wandern.

Bei dieser diskontinuierlichen Gelelektrophorese wurden die Proben zunächst in einem Sammelgel aufkonzentriert um danach von dort in das Trenngel zu wandern. Hierfür wurden Tris-Glycin-Polyacrylamidgele mit einem Gradienten von 8-15 % Acrylamid verwendet.

	Trenngel		Sammelgel
Gelkonzentration	8 %	15 %	
Aqua dest.	4,6 ml	2,3 ml	3,4 ml
Acrylamid (30 %)	2,6 ml	5 ml	0,83 ml
TRIS (1,5 M, pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	-
TRIS (1,0 M, pH 6,8)	-	-	0,63 ml
SDS (10 %)	-	-	50 µl
APS (10 %)	100 µl	100 µl	50 µl
Temed	10 µl	10 µl	5 µl

Um die Proben auf die Polyacrylamidgele auftragen zu können, wurden 30 µl einer Probe mit 10 µl Auftragspuffer (NuPage® LDS Sample Buffer, 4x) und 2 µl Antiproteasecocktail (1 Tablette Complete® Protease Inhibitor Cocktail in 20 ml Wasser gelöst) gemischt und für 5 min auf 95 °C erhitzt um die Proteine zu denaturieren und Proteasen zu inaktivieren.

Je 30 µl der Proben und 2 µl des jeweiligen Größenstandards wurden auf das Gel aufgetragen, die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 80 V, nach vollständigem Eintritt der Proben in das Sammelgel bei 120 V.

4.4.3 Silberfärbung

Um die Reinheit der Proteine zu prüfen und Kontaminationen darzustellen, wurde die Silberfärbung angewandt.

Nach der Auftrennung des Proteingemisches durch SDS-PAGE wurden die Proteine im Gel durch Schwenken im Fixierbad fixiert (30 min) und über Nacht in Inkubationslösung inkubiert. Auf dreimaliges Waschen mit Wasser für je 10 min folgte eine Inkubation des Gels in der Silberlösung für 30 min. Nach kurzem Waschen mit deionisiertem Wasser wurden die einzelnen Banden mit der Entwicklerlösung sichtbar gemacht und der Vorgang bei ausreichendem Färbungsgrad mit EDTA-Stopplösung für mindestens 15 min gestoppt. Die Stopplösung wurde anschließend durch deionisiertes Wasser ersetzt.

4.4.4 Westernblot

Nach der Auftrennung des Proteingemisches durch SDS-PAGE wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen. Dies erfolgte unter Kühlung nach dem Nassblott-Verfahren nach Towbin et al. (1979) in NuPage Transferpuffer bei 30 V für 1 h.

Nach Blockade freier Bindungsstellen mit Milchpulverlösung (5 %) für 2 h bei Raumtemperatur, erfolgte die Detektion des jeweiligen Proteins mit seinem primären Antikörper in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration und Lösung.

Anti c-myc 9E10	Blockierpuffer	1 µg/ml
Anti CXCL10	WesternBreezeBlockierlösung	0,75 µg/ml

Nach der Inkubation wurden die Membranen 4x mit TBST gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine weitere Stunde. Die Chemolumineszenz, durch die an den sekundären Antikörper (anti mouse IgG) konjugierte alkalische Phosphatase und das entsprechende Substrat hervorgerufen, wurde, nach

weiteren 4 Waschschritten mit TBST und 2 in TBS, mittels Auflegen von Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

4.4.5 ELISA

Um die Konzentration von CXCL10 in Kulturüberständen von HDMEC- und HMEC-Zellen sowie die Konzentration der CXCL10- Konstrukte in verschiedenen FPLC-Proben zu bestimmen, wurde ein kommerziell erhältliches Reagenzienpaket verwendet. Die verwendeten Protokolle entsprachen den Angaben des Herstellers. Um das Substrat für die Farbreaktion herzustellen, wurden die beiden Komponenten des BD OptEIA-Reagenz zu gleichen Teilen gemischt. Zur Quantifizierung der Farbreaktion in den einzelnen Proben wurde ein ELISA-Lesegerät mit zugehöriger Software verwendet.

Die Kulturüberstände der Zellen wurden bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

4.5 Weitere in-vitro Methoden

4.5.1 Transiente Transfektion von HMECs

Das zeitweilige Einbringen des Plasmids in die Wirtszelle wird als transiente Transfektion bezeichnet. Immortalisierte Endothelzellen wurden transient mit den Chemokinkonstrukten transfiziert um anschließend im Rahmen des *flow adhesion assays* (siehe unten) Interaktionen zwischen ihnen und Leukozyten zu messen. Hierfür wurden zwei verschiedene Methoden verwendet:

1. Magnetofektion:

Bei der Magnetofektion wird DNA über elektrostatische Wechselwirkungen mit magnetischen Beads verbunden, welche dann durch Anlegen eines magnetischen Feldes in die Zellen eingebracht wird. Es wurde ein kommerziell erwerbliches Kit der Firma Promocell verwendet. Die Versuchsdurchführung richtete sich im Wesentlichen nach dem mitgelieferten Protokoll. Um die optimalen Transfektionsbedingungen zu ermitteln, wurde der Versuch mit verschiedenen DNA-Mengen durchgeführt, wobei das Verhältnis μl (magnetische Nanopartikel): μg (DNA) 1:1 betrug.

2. Elektroporation:

Am Tag der Transfektion wurden HMECs verwendet, welche zu 60 %-70 % konfluent waren. Diese wurden mit Trypsin abgelöst und anschließend gezählt. Für einen Transfektionsansatz wurden zwei Millionen Zellen benötigt, welche bei 220xg 3 min zentrifugiert wurden. Das Zellpellet wurde dann in 400 μl RPMI mit 30 % FCS und der DNA, welche in die Zellen

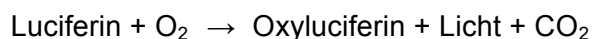
eingbracht werden sollte, aufgenommen. Auch hier wurden, um die optimale Versuchsbedingung zu ermitteln, verschiedene DNA-Mengen (30 µg-70 µg) benutzt. Die Zellsuspension wurde nun in Elektroporationsküvetten überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Elektroporation bei 200 V und 960 µF sowie für 10 min eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur.

Der Erfolg der Transfektion wurde anhand der Luciferaseaktivität, der eGFP-Expression oder mittels FACS-Analyse beurteilt.

4.5.2 Messung der Luciferaseaktivität

Um die Effizienz der transienten Transfektion zu ermitteln, wurden HMECs mit einem Vektor, welcher das Reportergen für das Enzym Renilla Luciferase aus dem Coelenteraten *Renilla reniformis* enthält, transfiziert.

Renilla Luciferasen sind Enzyme, die folgende Reaktion ermöglichen:



Wenn das Substrat für diese Reaktion im Überschuss vorliegt, ist die Lichtemission proportional zur Renilla Luciferasekonzentration und kann in einem Luminometer gemessen werden.

Für diesen Versuch wurden die mit Renilla-Luciferase transfizierten Zellen in eine sechs-Loch-Platte überführt und nach 24 h einmal mit PBS gewaschen. Als Negativkontrolle dienten HMECs, welche mit pIRES2-eGFP-CXCL10-GPI transfiziert wurden. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl 1x PassiveLysisBuffer (Fa. Promega) pro Versuchsansatz aufgenommen und 15 min bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die anschließende Messung der Lichtemission erfolgte nach Zugabe von einem das Substrat der Renilla Luciferase enthaltenen Puffer (Fa. Promega) mittels eines Luminometers nach den Angaben des Herstellers.

4.5.3 Fluoreszenzmikroskopie

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht darauf, dass verschiedene Substanzen (Fluorochrome) durch die Aufnahme von Licht bestimmter Wellenlänge angeregt werden (Absorption) und infolgedessen Licht definierter Frequenzen emittieren (Emission) können. Es wird die Primär- oder Eigenfluoreszenz von der Sekundärfluoreszenz, welche erst nach Behandlung mit Fluorchromen auftritt, unterschieden. Wenn Zellen oder Gewebe Fluorochrome enthalten, können nach Anregung die emittierten Frequenzen am Mikroskop dargestellt werden. Diese Anregung wird durch UV-Lampen erzeugt, deren breites Spektrum

durch nachgeschaltete Filterblöcke auf die erwünschte Wellenlänge reduziert wird. Das daraufhin emittierte Licht (im jeweiligen Emissionsspektrum der Fluorochrome) wird nun vom anregenden Licht getrennt, so dass die emittierenden Strukturen dargestellt werden können.

Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen, wurde das Fluorochrom eGFP benutzt. EGFP wird durch Licht der Wellenlänge von 396 nm oder 575 nm angeregt und emittiert grünes Licht der Wellenlänge 508 nm.

Außerdem sollte die Oberflächenpräsentation der GPI verankerten Chemokine durch Immunfluoreszenz dargestellt werden. Hierfür wurde ein Sekundärantikörper verwendet, welcher mit PE konjugiert war. PE besitzt ein Absorptionsmaximum von 488 nm und ein Emissionsmaximum von 575 nm im orangefarbenen Bereich.

1×10^4 der mit CXCL10-(mucin)-myc-GPI transfizierten Zellen wurden in Schälchen ausplattiert und nach 24 h für 45 min mit einem CXCL10-Antikörper in FCS freiem Medium (1 ml mit 10 µg/ml) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine Inkubation mit dem PE konjugierten Sekundärantikörper (1 ml mit 10 µg/ml). Nach erneutem Waschen mit FCS konnten die Zellen mikroskopiert werden. Als Negativkontrolle diente GPI-verankertes Ovalbumin.

4.5.4 Leukozytenadhäsion an Endothelzellen unter kontinuierlichem Fluss

Um das Rollen sowie die Adhäsion von Leukozyten auf einem konfluenten Zellrasen aus zuvor behandelten mikrovaskulären Zellen zu messen, wurden *flow adhesion assays* durchgeführt. Der hierfür entwickelte Versuchsaufbau sollte dem mikrovaskulären Blutgefäßsystem, in welchem Rekrutierung von Leukozyten stattfindet, nachgestellt sein. So flossen Leukozyten mit einer bestimmten Flussrate an mikrovaskulären Zellen, welche vorher entweder mit den klonierten CXCL10-Konstrukten transfiziert oder mit den entsprechenden Proteinen reinkorporiert wurden, vorbei und wurden mit Hilfe einer Umkehrkamera aufgenommen.

Die folgende Abbildung zeigt den Versuchsaufbau:

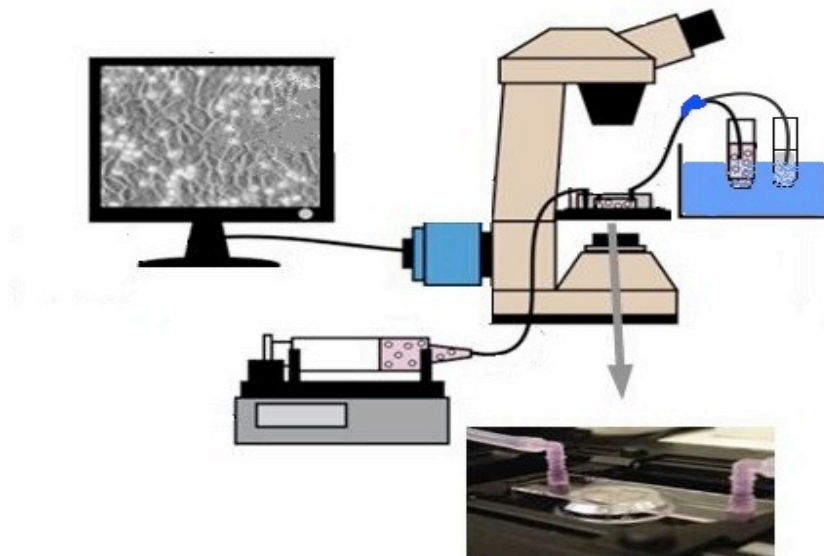


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Messung von Leukozyten an Endothelzellen unter kontinuierlichem Fluss.

Auf dem Objektisch wurde der Schlitten platziert, welcher einen Mikrokanal mit einem Einlass und einem Auslass enthält, in welchem die mikrovaskulären Zellen zuvor ausgesät wurden. Diese unterlagen unterschiedlichen Behandlungen:

1. Immortalisierte mikrovaskuläre Zellen (HMEC) wurden, wie oben beschrieben, 24 h vor Durchführung des *flow adhesion assay*, transient mit den Chemokinkonstrukten transfiziert. Von einem Transfektionsansatz wurden 70 µl entnommen und auf ein Gesamtvolumen von 200 µl mit Kulturmedium aufgefüllt, welches dann in einen Schlitten pipettiert wurde um dort bis zum folgenden Tag einen konfluenten Zellrasen zu bilden.

2. 4 h vor dem Assay wurden HMECs oder HDBECs mit den jeweiligen Proteinen wie oben beschrieben reinkorporiert, anschließend einmal mit PBS gewaschen und in einen Schlitten ausplattiert.

Falls die Endothelzellen mit IL1β stimuliert wurden, fand dies mit einer Konzentration von 10 ng/ml 12 h vor dem Versuch statt.

Der Auslass des Mikrokanals mit den Zellen wurde über einen Perfusorschlauch mit einer 50 ml-Spritze in einer elektrischen Spritzenpumpe, der Einlass über ein Dreiwegehahn-Perfusorschlauchsystem mit 1. einem Falcon mit *assay buffer*, 2. einem Falcon mit der

Leukozytensuspension in *assay buffer* verbunden. Beide Falcons befanden sich in einem beheizten Wasserbad (37 °C). Der *assay buffer* wurde direkt vor Beginn des Versuches frisch hergestellt, sterilfiltriert und auf 37 °C erwärmt. Die hierin aufgenommenen Leukozyten hatten eine Endkonzentration von 200.000 Zellen/ml *assay buffer*. Nach einmaligem Spülen des Endothelzellrasens mit *assay buffer* wurden die Suspensionszellen mit einer definierten Geschwindigkeit durch den Mikrokanal gesaugt, wo sie mit den Endothelzellen interagieren konnten. Dieser Vorgang wurde mittels eines Umkehrmikroskops mit angeschlossener CCD-Kamera und entsprechender Software in Form von Videos aufgezeichnet und später ausgewertet (siehe unten). Für jeden Schlitten wurden 5 min Videomaterial bei 175 facher Vergrößerung digital aufgezeichnet.

Ausgehend von der Geometrie des Kanals und der Viskosität des eingesetzten Puffers ließen sich die im Inneren des Kanals auf die interagierenden Endothel- und Suspensionszellen wirkenden Scherkräfte relativ genau berechnen. Diese Scherkraft ist in Bereichen, die 0,5 mm vom Rand des Kanals entfernt liegen, konstant. In allen Versuchen wurde *Hank's balanced salt solution* verwendet. Die exakte Viskosität dieses Puffers beträgt $0,01 \text{ dyn} \times \text{sec}/\text{cm}^2$ (Donahue, 2003). Mit Hilfe dieser Angabe konnte für jede beliebige Flussrate die entsprechende, auf die Zellen wirkende Scherkraft berechnet werden. Zunächst wurde der Kanal mit Assay buffer in einer Flussrate von 1 ml/min gespült, um Zellreste auf dem Endothelrasen zu entfernen. Anschließend wurde die Flussrate verringert, so dass ein konstanter Fluss der Leukozytensuspension mit einer Scherkraft von $0,4 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ entstand. Diese Scherkraft ist etwas niedriger als die in Arteriolen und Venolen zu findenden Werte von $1\text{-}2 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ (Abbassi, 1993; House und Lipowsky, 1988), sorgte aber dafür, dass auch schwächere Interaktionen festgestellt und quantifiziert werden konnten.

Für die Auswertung der Daten wurde das beobachtete Blickfeld in acht Rechtecke unterteilt. In jedem dieser Rechtecke wurde einzeln die Zahl der Zellen ausgezählt, welche während der Videoaufnahme (5 min) eine feste oder eine rollende Adhäsion auf den Endothelzellen zeigten. Als feste Adhäsion wurde ein Zellarrest von über 30 sec gewertet. Bei einer rollenden Adhäsion zeigte sich ein plötzlicher Arrest der Zelle auf dem Endothel. Die Zelle bewegte sich anschließend jedoch langsam in Richtung des Flüssigkeitsstromes weiter. Falls die rollende Zelle innerhalb des Blickfeldes eine spätere feste Adhäsion zeigte, wurde diese nur als solche gewertet. Die Summe der verschiedenen Ereignisse aller acht Rechtecke wurde anschließend in Ereignisse pro mm^2 Endothel umgerechnet (ein komplettes Sichtfeld entsprach bei 175facher Vergrößerung $0,625 \text{ mm}^2$).

4.5.5 Messung der Proliferation von Endothelzellen

Wie oben beschrieben spielt CXCL10 eine Rolle in der Hemmung der Angiogenese. Da diese von einer Hemmung der Zellproliferation abhängt, wurde für das gereinigte Protein seine Wirkung auf die Zellproliferation untersucht.

Durch den Proliferationsassay wird die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen in Zellen bestimmt. Dies geschieht, indem Tetrazoliumbromid MTT (S) in die Zellen eindringt und dessen Ring durch mitochondriale Dehydrogenasen aufgebrochen wird. Das MTT wird zu Formazan reduziert und bildet einen dunkelblauen kristallinen Niederschlag. Durch Zugabe von HCL-Isopropanol kann das Formazan in Lösung gebracht und mittels Photometer gemessen werden. Das Ergebnis spiegelt die metabolische Aktivität der Zellen und somit die Proliferation wider.

24 h vor Beginn des Versuches wurden HDBECs (5×10^4) in Flachbodenplatten in 100 μ l Medium gesät. Zunächst wurden die Zellen mit dem jeweiligen Proliferationsmedium versetzt. Dieses enthielt verschiedene Zusätze: CXCL10-GPI, CXCL10-muzin-GPI, rhCXCL10, denturiertes CXCL10-(muzin)-GPI, Penicillin/Streptomycin oder TSK-Säulenpuffer. Ein Ansatz wurde mit reinem Medium inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂ über einen Zeitraum von 24, 48 oder 72 h. Anschließend wurden je 50 μ l MTT-Lösung hinzugegeben (1 mg/ml). Nach einer weiteren Inkubation von 3 h, wurden die Zellen zentrifugiert (5 min/2000 g). Die entstanden Formazankristalle wurden mit Isopropanol (100 μ l) und HCL (0.4 N) gelöst spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen. Die gemessene Extinktion korrelierte dabei mit der Anzahl proliferierender Zellen.

4.5.6 Migrationsversuch

Um für spätere Versuche zu untersuchen, ob sich murine Milzzellen entlang eines Gradienten von rhCXCL10 sowie der aufgereinigten Chemokinkonstrukte bewegen, wurden Migrationsversuche durchgeführt. Hierfür wurden 10⁶ Milzzellen (Isolation siehe 4.3.4) in 100 μ l RPMI mit 1 % FCS in die obere Kammer des Transwell systems (Fa Costar, Porengröße 0,3 μ m) gegeben, während die untere Kammer mit 700 μ l einprozentigem RPMI und 2,5 ng/ml rekombinantem CXCL10, CXCL10-GPI oder CXCL10-muzin-GPI gefüllt wurde. Der Migrationsassay wurde drei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ belassen. Anschließend wurden die in die untere Kammer migrierten Zellen gezählt. In weiteren Versuchen wurde der Inhalt der unteren Kammer durchflusszytometrisch analysiert, um die migrierten Zellpopulationen aufzuschlüsseln. Hierfür wurde die Migration jedes Ansatzes in fünf weiteren Kammern durchgeführt um für die Durchflusszytometrie eine ausreichende Zahl an Zellen zur

Verfügung zu haben. Als Negativkontrolle diene bei sämtlichen Versuchen in der unteren Kammer RPMI mit 1 % FCS, als Positivkontrolle RPMI mit 10 % FCS.

5 Ergebnisse

Das Ziel der Präsentation und Funktionsausübung von GPI-verankertem (mucin-) CXCL10 auf der Oberfläche mikrovaskulärer Endothelzellen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, sollte parallel durch die transiente Transfektion immortalisierter mikrovaskulärer Endothelzellen mit Vektoren, welche die Gensequenz für CXCL10-(mucin)-GPI enthielten, sowie durch die Reinkorporierung der entsprechenden Proteine nach Aufreinigung in Endothelzellen erreicht werden. Die Transfektionsversuche wurden in Zusammenarbeit mit Constantin Lapa durchgeführt.

5.1 Transiente Transfektion von immortalisierten Endothelzellen

Die transiente Transfektion von mikrovaskulären Endothelzellen sollte zu einer vorübergehenden Expression des Chemokinkonstruktes auf der Zelloberfläche führen und somit Probleme, welche bei der Proteinisolation und Proteinreinkorporierung auftreten können, umgehen. Zunächst musste ein schonendes und effektives Transfektionsverfahren gefunden werden, um die Expression der GPI-verankerten Konstrukte auf mikrovaskulären Zellen zu gewährleisten.

5.1.1 Subklonierung der CXCL10-Konstrukte in den pIRES2-eGFP Vektor

Um eine Detektion der transfizierten Zellen zu vereinfachen oder überhaupt zu ermöglichen, wurden jeweils die DNA-Fragmente CXCL10-GPI und CXCL10-mucin-GPI in den bicistronischen pIRES2-eGFP-Vektor kloniert. Dieser Vektor besitzt eine interne ribosomale Bindungsstelle zwischen der *multiple cloning site*, in welche ein beliebiges Gen kloniert werden kann, sowie dem Gen für eGFP. Dank dieser Bindungsstelle wird bei gleichzeitiger Translation einer RNA die Expression von zwei unterschiedlichen Proteinen ermöglicht. Da das eGFP durch seine Fluoreszenz gut detektierbar ist, kann hieraus auf die gleichzeitige Expression des gewünschten Proteins geschlossen werden.

Die folgende Abbildung verdeutlicht den Aufbau des Vektors sowie den Klonierungsvorgang.

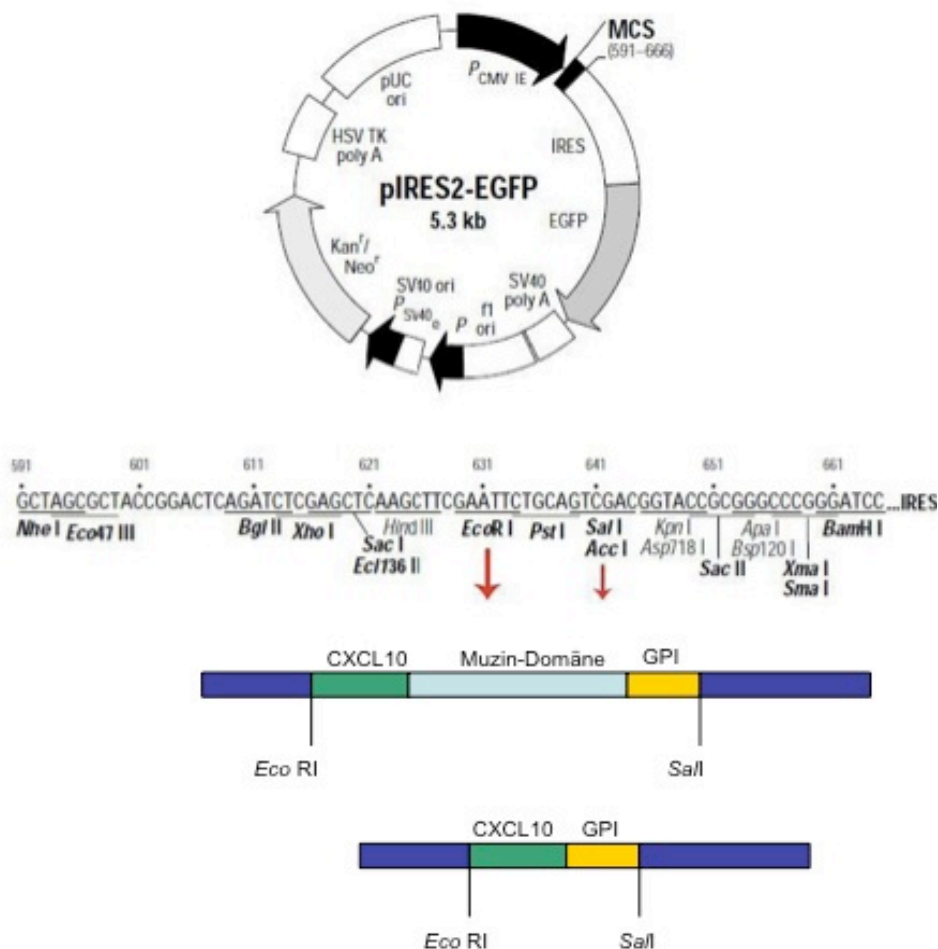


Abbildung 8: Subklonierung in den pIRES2-eGFP Vektor. Dargestellt ist oben der verwendete pIRES2eGFP Vektor mit seiner internen Ribosomenbindungsstelle (IRES), welche sich zwischen der „multiple cloning site“ (MCS) sowie dem Gen für das eGFP befindet. Darunter zu erkennen sind die multiple cloning site des pIRES2-eGFP-Vektors mit den entsprechenden Schnittstellen der Restriktionsenzyme sowie CXCL10-muzin-GPI bzw. CXCL10-GPI mit den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *SalI*. Nach Eröffnung des Vektors konnten die Konstrukte in diesen ligiert werden.

5.1.2 Transiente Transfektion mittels Magnetofektion

Da die Magnetofektion eine niedrigere Mortalitätsrate der behandelten Zellen aufweisen soll als die Elektroporation und eine geringere Menge Plasmid benötigt, wurde diese Methode für die Transfektion der immortalisierten Endothelzellen angewandt. Auch wäre es möglich, diese Methode *in vivo* anzuwenden, um zum Beispiel in einem Mausmodell Zellen mit den Konstrukten zu transfizieren.

Um ein optimales Transfektionsergebnis zu erreichen, wurde die Transfektion mit steigender Konzentration eines Plasmids, welches als Reportergen die Renilla-Luciferase enthielt, durchgeführt. Die Zellen wurden nach 24 h lysiert und die Aktivität der Renilla-Luciferase mittels Luminometer gemessen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte von drei Versuchen und stellt die Aktivität der Renilla-Luciferase in Abhängigkeit von der verwendeten Plasmidmenge dar. Als Negativkontrolle diente pIRES2-eGFP-CXCL10-GPI. Um die einzelnen Werte vergleichen zu können, wurde pro Versuchsansatz konstant mit 3×10^5 Zellen gearbeitet.

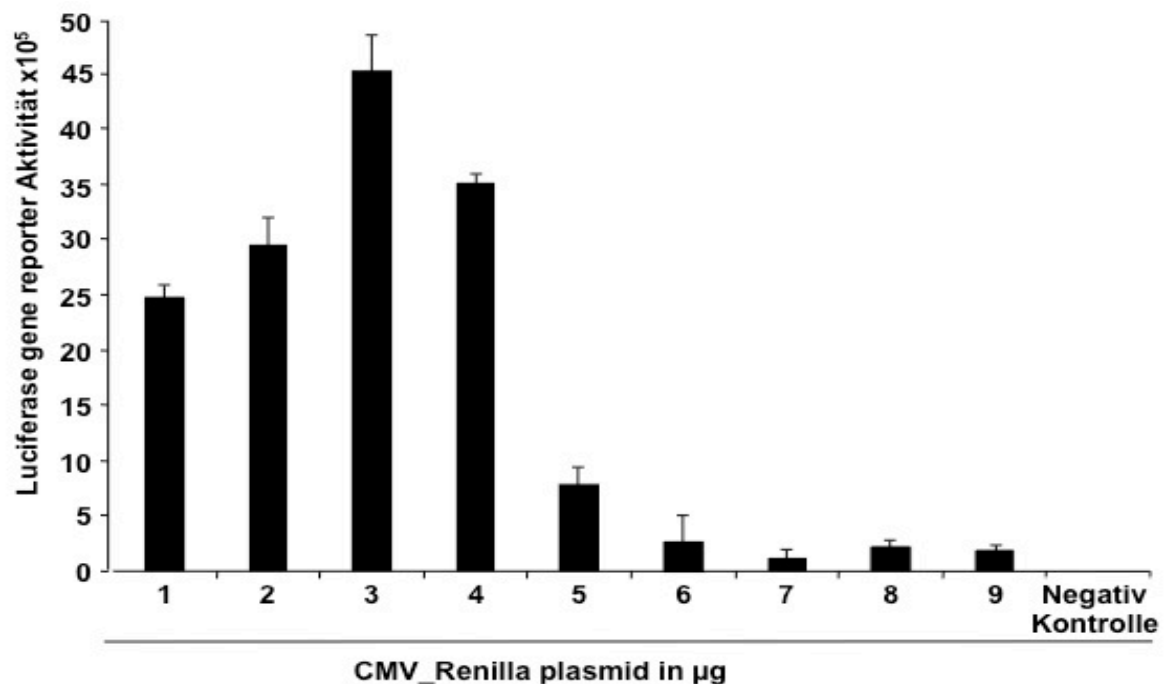


Abbildung 9: Renilla-Luciferase-Aktivität nach transienter Transfektion mittels Magnetofektion. Dargestellt ist die Aktivität der Renilla-Luciferase in relativen Lichteinheiten (RLU) in Abhängigkeit von der Menge des verwendeten CMV-Renilla-Plasmids (Mittelwert aus drei Versuchen). 24 h nach transienter Transfektion von HMECs mittels Magnetofektion wurden die Zellen lysiert und die Renilla-Luciferase-Aktivität im Luminometer ermittelt.

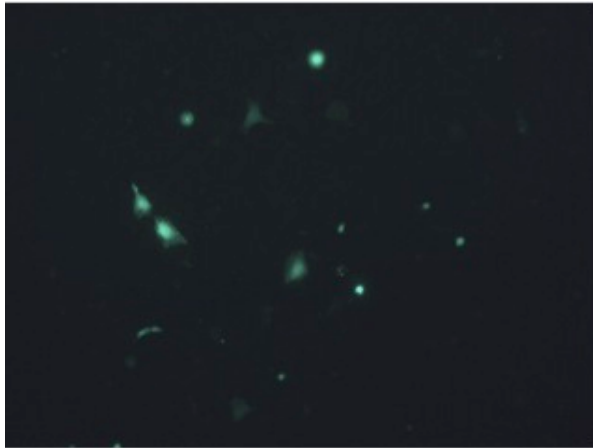
Es ist deutlich zu erkennen, dass die Transfektionseffizienz bei einer Plasmidmenge von 3 µg mit 55×10^5 RLU am höchsten ist und insbesondere bei höheren Konzentrationen stark sinkt.

Da man durch die Messung der Renilla-Luciferase-Aktivität keine Aussage zu dem Anteil der transfizierten Zellen machen kann, wurden nun HMECs mit dem Plasmid pIRES2-eGFP-CXCL10-GPI (3 µg pro 3×10^5 Zellen) transfiziert und nach 24 h mittels FACS-Analyse und Fluoreszenzmikroskopie auf die Transfektionseffizienz hin untersucht.

Die FACS-Analyse zeigte, dass der Anteil der mit dem Plasmid erfolgreich transfizierten HMECs 3,2 % betrug.

Die Fluoreszenzmikroskopie bestätigte dieses Ergebnis.

a) Fluoreszenz



b) Hellfeld

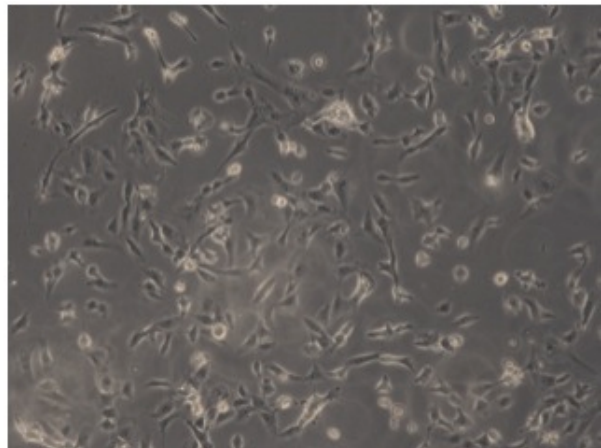


Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopie von HMECs nach transienter Transfektion mittels Magnetofektion mit pIRES2-eGFP-CXCL10-GFP (Vergrößerung 175-fach). Nach Transfektion wurden die HMECs mikroskopiert und auf das Vorhandensein eines Fluoreszenzsignals durch eGFP-Expression hin untersucht. Abbildung a) zeigt einen beispielhaften Bildausschnitt in der Fluoreszenz, b) im Hellfeld.

Die Abbildung zeigt einen Bildausschnitt in der Fluoreszenz sowie im Hellfeld. Die transfizierten Zellen fluoreszieren grün. Ihr niedriger Anteil verdeutlicht den geringen Transfektionserfolg.

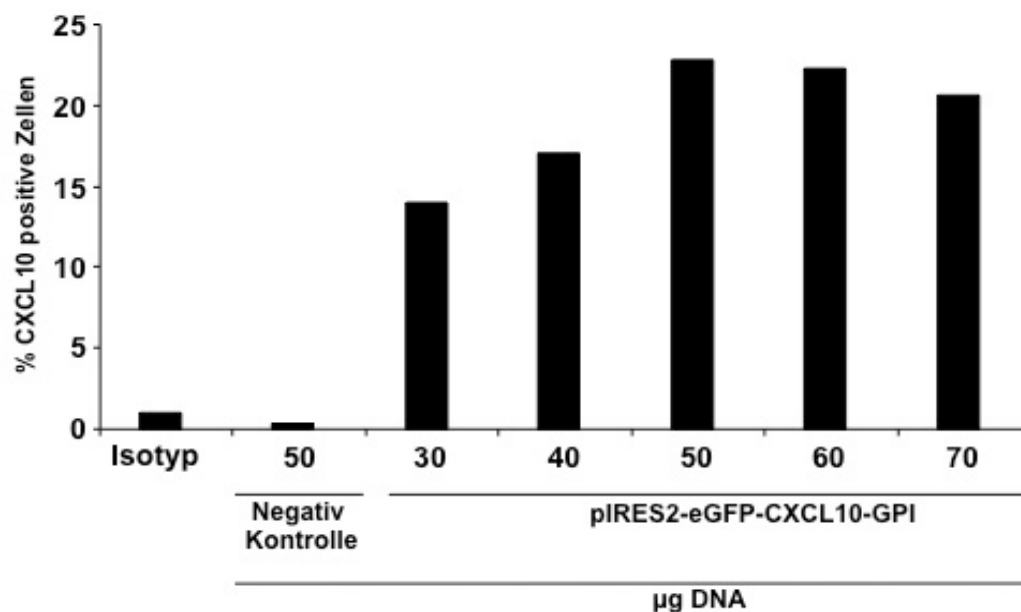
Auch bei wiederholten Versuchen konnte keine höhere Transfektionseffizienz erreicht werden, so dass die Magnetofektion als Transfektionsmethode verlassen wurde.

5.1.3 Transiente Transfektion mittels Elektroporation

Für die funktionellen Versuche ist eine Transfektionsrate von mindestens 20 % wünschenswert, um den Effekt der GPI-verankerten Chemokine auf Leukozyten prüfen zu können. Da diese Voraussetzung durch die Magnetofektion nicht erreicht werden konnte, wurden die Zellen nun durch Elektroporation transfiziert.

Es wurde evaluiert, dass die bei der Elektroporation als sehr hoch anzusehende Mortalitätsrate der Zellen bei einer Pufferzusammensetzung mit 30 % FCS am geringsten ausfällt. Um festzustellen, welche Menge an DNA zu einem optimalen Transfektionsergebnis führt, wurden Zellen mit DNA in aufsteigender Konzentration mit pIRES2-eGFP-CXCL10-GPI transfiziert und das Ergebnis mittels FACS-Analyse ermittelt.

a)



b) pIRES2-eGFP-CXCL10-GPI

untransfizierte Kontrolle

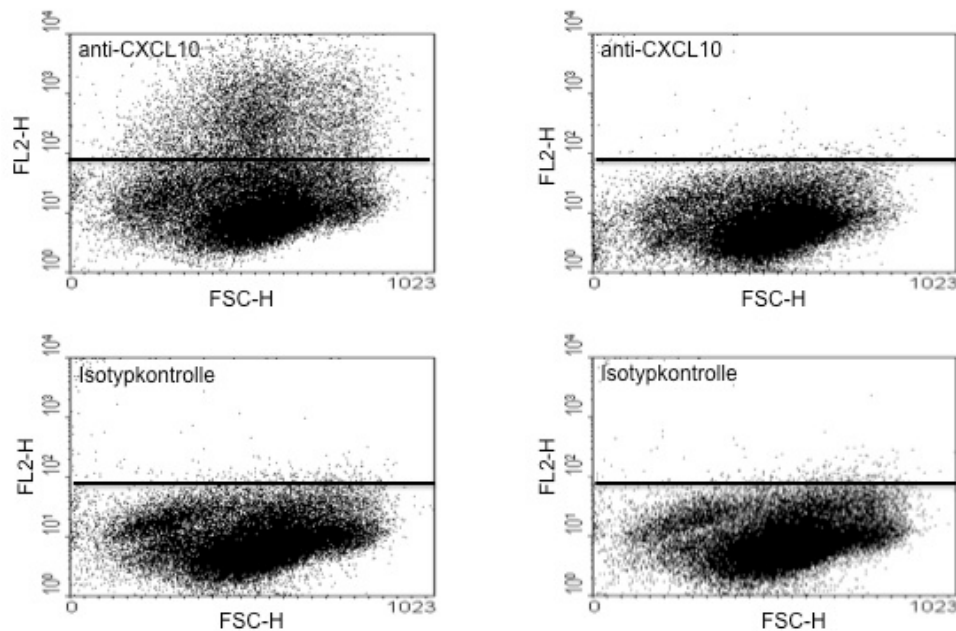


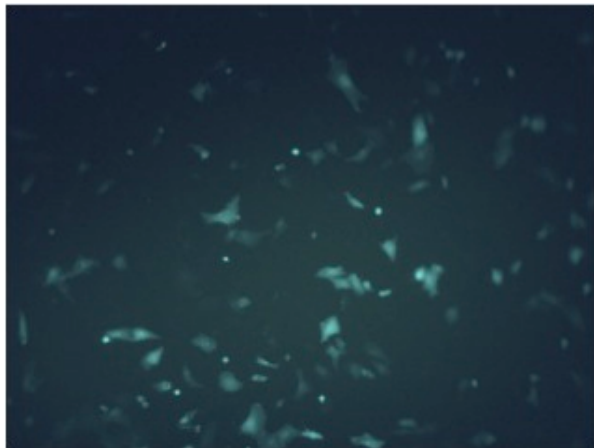
Abbildung 11: FACS-Analyse der HMECs nach transienter Transfektion mit pIRES2-eGFP-CXCL10-GPI.

a) Dargestellt ist der prozentuale Anteil transient transfizierter HMECs mittels Elektroporation. Die Oberflächenexpression von CXCL10 wurde nach Transfektion der Zellen mit steigender Menge an DNA durchflusszytometrisch untersucht. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte HMECs.

b) Beispielhafte Darstellung von Dot Plots der durchflusszytometrischen Untersuchung. Die Zellen wurden mit einem Primärantikörper gegen CXCL10 bzw. dem entsprechenden Isotypkontrollantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper diente ein RPE-konjugierter anti-goat-Antikörper. Auf der Ordinate ist die Fluoreszenz als Maß für die Bindung der Antikörper an CXCL10 auf transfizierten Zellen, auf der Abszisse der forward scatter als Maß für die Zellgröße aufgetragen. Links abgebildet sind die Ergebnisse der transfizierten Zellen, rechts die der untransfizierten HMECs.

Es zeigte sich, dass die Transfektionsrate bei einem Einsatz von 50 µg des Plasmids mit über 20 % transfizierter Zellen am höchsten ist. Dieses reproduzierbare Ergebnis konnte auch mit der Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden.

a) Fluoreszenz



b) Hellfeld



Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopie von HMECs nach transienter Transfektion mittels Elektroporation mit pIRES2-eGFP-CXCL10-GPI (Vergrößerung 175 fach). Nach Transfektion wurden die HMECs mikroskopiert und auf das Vorhandensein eines Fluoreszenzsignals durch eGFP-Expression hin untersucht. Abbildung a) zeigt einen beispielhaften Bildausschnitt in der Fluoreszenz, b) im Hellfeld.

In dem fluoreszenzmikroskopischen Bildausschnitt ist eine große Anzahl von Zellen zu erkennen, welche eGFP exprimieren und somit erfolgreich mit dem Plasmid transfiziert wurden.

5.2 Proteinchemische Isolation von CXCL10-(mucin)-mycTag-GPI

5.2.1 Klonierung und Expression der Chemokinkonstrukte

Da die proteinchemische Aufreinigung von CXCL10-GPI sowie CXCL10-mucin-GPI kein zufriedenstellendes Ergebnis sowohl in der Menge der gereinigten Proteine als auch in deren Reinheitsgrad ergab (siehe Dissertation von Constantin Lapa) und somit funktionelle Versuche schwer zu realisieren waren, sollte die säulenchromatographische Aufreinigung mit Hilfe eines Protein tags (c-mycTag) vorgenommen werden. Hierfür wurden zunächst die Chemokin-GPI-Konstrukte mit einem internen c-mycTag kloniert.

5.2.1.1 CXCL10-myc-GPI und CXCL10-Mucin-GPI zeigen die erwarteten Größen

Für die Klonierung von CXCL10-myc-GPI stand ein Konstrukt zur Verfügung, welches bereits in einem pUC19 Vektor die GPI-Anker-Signalsequenz von LFA-3, sowie die Sequenz des Doppel-mycTags an dem 5'-Ende der GPI-Signalsequenz enthielt. Die kodierende Sequenz für CXCL10 wurde mittels PCR amplifiziert und in diesen Vektor ligiert. Anschließend erfolgte außerdem die Subklonierung in den pEF-dhfr Vektor um eine Expression in DHFR-defiziente

Chinese Hamster Ovary Zellen CHO dhfr^(-/-) Zellen zu ermöglichen. Die folgende Abbildung zeigt schematisch den Vorgang der Klonierung.

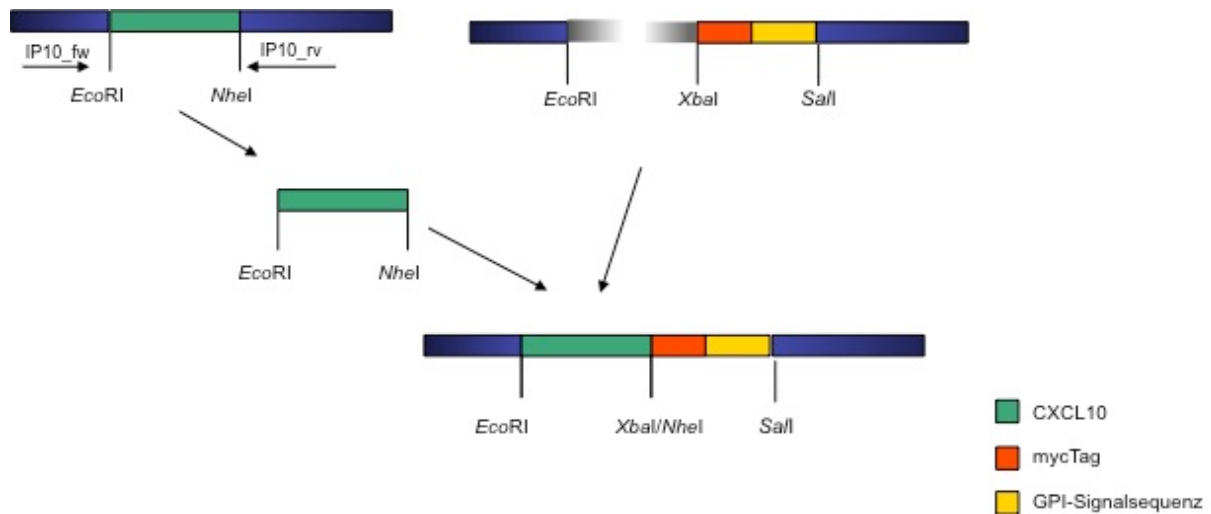


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Klonierung von CXCL10-mycTag-GPI.

E. coli DH5α wurde anschließend mit dem klonierten Plasmid transformiert und vermehrt um daraus die Plasmid-DNA zu isolieren. Diese wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SalI* verdaut und auf ein Agarosegel aufgetragen um zu demonstrieren, dass das herausgeschnittene Fragment die erwartete Größe aufweist.

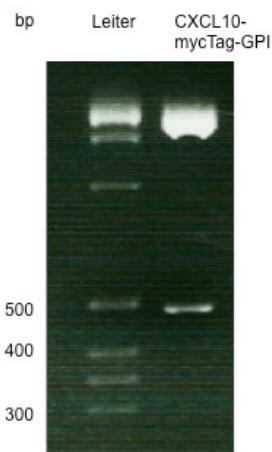


Abbildung 14: Elektrophoretische Auftrennung von CXCL10-mycTag-GPI. Dargestellt ist die Auftrennung des aus dem Vektor herausgeschnittenen Fragments CXCL10-mycTag-GPI im Agarosegel (2 %).

Man erkennt durch Vergleich mit dem Leiter, dass das herausgeschnittene Fragment, welches die Gensequenz für CXCL10-mycTag-GPI-Signalsequenz enthalten soll, eine

Größe von 500 bp (Basenpaare) aufweist. Hierbei entfallen 317 bp auf die CXCL10-Domäne, 66 bp auf den mycTag sowie 117 auf die Signalsequenz für den GPI-Anker. Da man auf Grund der nachgewiesenen Größe von einer erfolgreichen Klonierung ausgehen konnte, wurde das Plasmid, welches die Gensequenzen für CXCL10-mycTag-GPI enthielt, wiederum in Bakterien vermehrt, isoliert und sequenziert um eventuell aufgetretene Mutationen auszuschließen.

Die Klonierung von CXCL10-muzin-mycTag-GPI wurde, wie unter 3.2.11.2 beschrieben, durchgeführt. Um CXCL10 aus dem zuvor beschriebenen Konstrukt CXCL10-mycTag-GPI mittels Restriktionsenzymen herauszuschneiden zu können, sollte an der Schnittstelle *NheI/XbaI*, eine gezielte Mutation herbeigeführt werden, um eine reine *NheI*- Schnittstelle zu erzeugen. Hierfür wurden spezielle Primer entworfen, welche die gewünschte Punktmutation enthielten. Die folgende Abbildung zeigt zur Verdeutlichung sowohl die Mutagenese-Primer als auch das zu mutierende Template. Das zu mutierende Basenpaar ist rot dargestellt.

5'-taaaagatctcctgctagcgaacagaagctgacgac-3'	Primer forward
cagatcttctagaggacgatc	Template
cttcttgcactagtcgctc	
gtctaaaagatctcctgctag	Template
gaacagaagctgacgag	
3'-atttctagaggacgatcgcttgcactagtcg	Primer reverse

Abbildung 15: Primerdesign für die gezielte Mutagenese. Dargestellt sind die Primer (*reverse; forward*), welche die gewünschte Mutation enthalten. Rot dargestellt sind die Basen des Templates, deren Mutation das Ziel ist.

CXCL10 konnte anschließend in einen pUC19 Vektor, welcher bereits die muzinähnliche Domäne von CX3CL1, die Sequenz des Doppel-mycTags sowie die Signalsequenz des GPI-Ankers enthielt, kloniert werden. Auch hier erfolgte eine Subklonierung in den pEF dhfr-Expressionsvektor. Die folgende Abbildung soll die Klonierung schrittweise verdeutlichen.

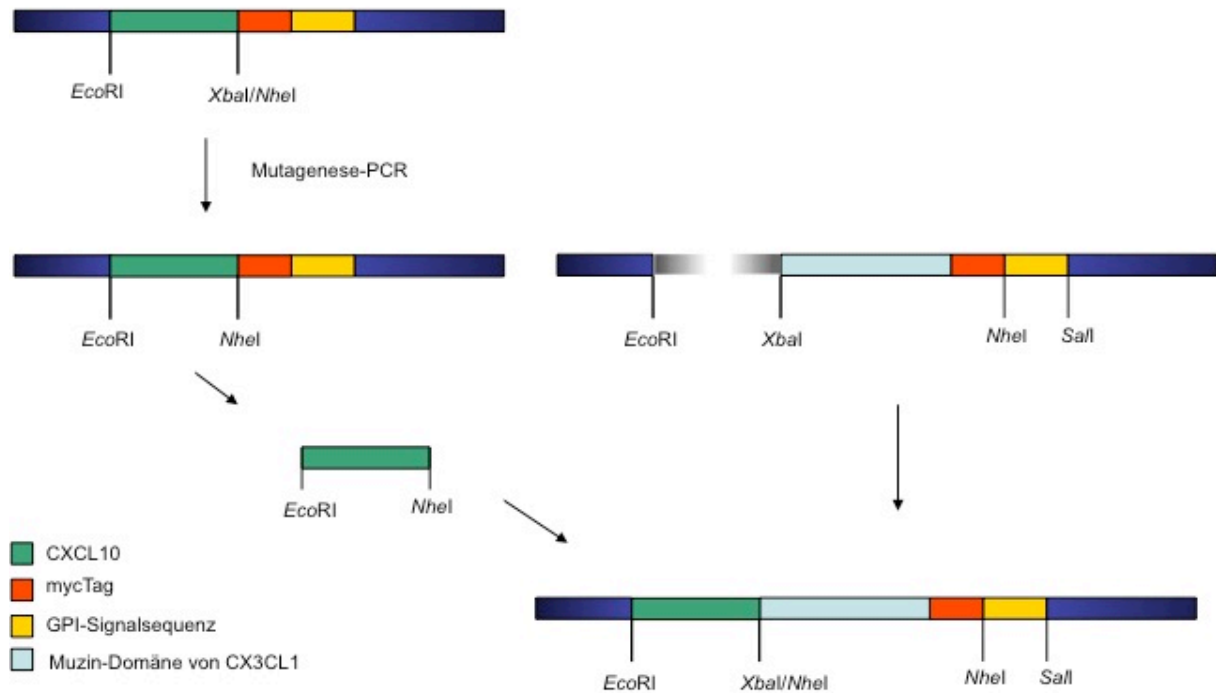


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Klonierung von CXCL10-mucin-mycTag-GPI.

Anschließend wurde *E. coli* DH5α mit dem klonierten Plasmid transformiert und vermehrt. Das daraufhin isolierte Plasmid zeigte die erwartete Größe von 1235 bp. Zusätzlich zu den 500 bp (CXCL10-mycTag-GPI-Signalsequenz) entfielen hier 735 bp auf die muzinartige Domäne von CX3CL1.

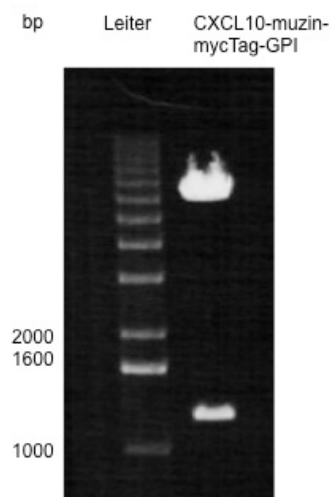


Abbildung 17: Elektrophoretische Auftrennung von CXCL10-mucin-mycTag-GPI. Dargestellt ist die Auftrennung des aus dem Vektor herausgeschnittenen Fragments CXCL10-mucin-mycTag-GPI im Agarosegel (0,6 %).

Nach einer erneuten Vermehrung des Plasmids in Bakterien, wurde es isoliert und sequenziert.

Die Sequenzierungen beider Konstrukte ergaben die geplanten Nukleotidsequenzen.

5.2.1.2 Konstruktachweis auf der Oberfläche der transfizierten CHO-Zellen

Die Vektoren wurden nun mittels Elektroporation stabil in CHO-dhfr^(-/-)-Zellen transfiziert. Nach mehrmaligem Teilen der Zellen wurde die Oberflächenexpression des GPI-verankerten CXCL10-mycTag sowie CXCL10-muzin-mycTag der transfizierten Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle durch FACS-Analysen kontrolliert. Verwendet wurden hier ein anti-mycTag-Antikörper sowie ein Isotyp-Kontrollantikörper. Als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte CHO-dhfr^(-/-)-Zellen.

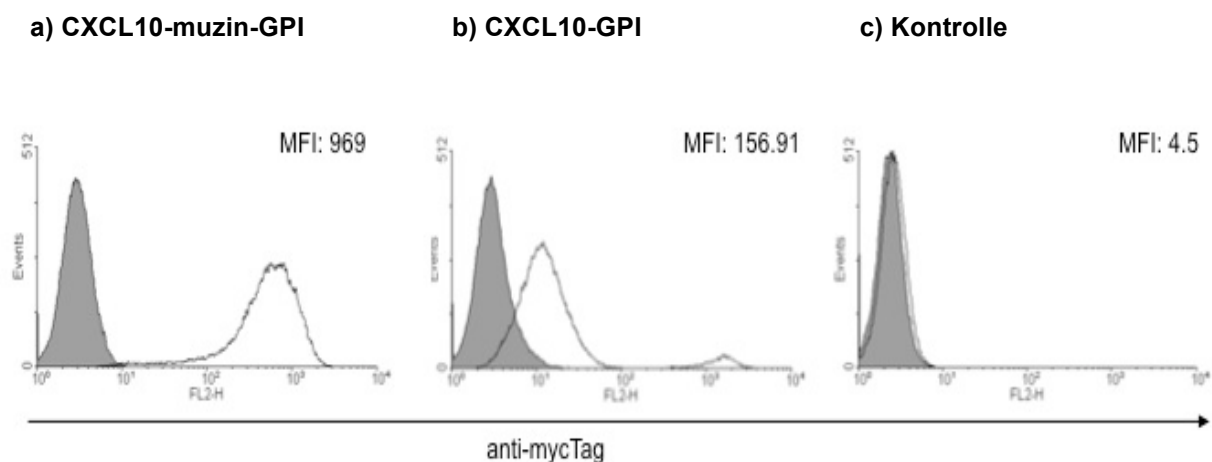


Abbildung 18: Oberflächenexpression von CXCL10-muzin-mycTag sowie CXCL10-mycTag auf der Zelllinie CHO-dhfr^(-/-). Dargestellt sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie nach Inkubation von stabil transfizierten CHO-dhfr^(-/-) mit einem spezifischen anti-mycTag-Antikörper (schwarze Linie) sowie dem entsprechenden Isotypkontrollantikörper (grau hinterlegt). Der Sekundärantikörper ist RPE konjugiert. Abbildung a) zeigt das Ergebnis der Messung von CXCL10-muzin-mycTag auf der Oberfläche der Zellen, b) von CXCL10-mycTag, c) stellt die Negativkontrolle dar. Angegeben ist jeweils die MFI (*mean fluorescence intensity*). MFI der Isotypkontrollen nicht gezeigt.

Eine Rechtsverschiebung von Kurvenverläufen bedeutet ein verstärktes Fluoreszenzsignal und somit eine größere Anzahl Zellen, an welche der Primärantikörper gebunden hat. Deutlich zu sehen ist, dass die Kurve der mit dem anti-mycTag Antikörper inkubierten nicht transfizierten CHO-dhfr^(-/-)-Zellen im Vergleich zu ihrer Isotypkontrolle eine nur sehr geringe Rechtsverschiebung aufweist, während die Kurve des Antikörperansatzes der mit CXCL10-muzin-mycTag-GPI transfizierten CHO-dhfr^(-/-)-Zellen eine deutliche Rechtsverschiebung in

Bezug auf die Kurven der Isotypkontrolle zeigt, so dass man davon ausgehen kann, dass die Selektion der transfizierten Zellen hier erfolgreich war.

Die Antikörperbindung gegen den c-mycTag von CXCL10-mycTag-GPI zeigt einen Kurvenverlauf mit zwei Maxima. Das erste Maximum ist nur leicht nach rechts verschoben, während sich das zweite kleinere Maximum deutlich positiv gegenüber der Isotypkontrolle präsentiert.

Da auch ein wiederholter Versuch kein hiervon abweichendes Ergebnis brachte, musste davon ausgegangen werden, dass die Selektion positiver Klone hier nur teilweise erfolgreich war. Aus diesem Grund wurde eine fluoreszenzaktivierte Zell-Sortierung durchgeführt, wodurch die stark positive Zellpopulation isoliert wurde. Nach Erholung der Zellen wurde wiederum die Oberflächenexpression von CXCL10-mycTag-GPI durchflusszytometrisch bestimmt.

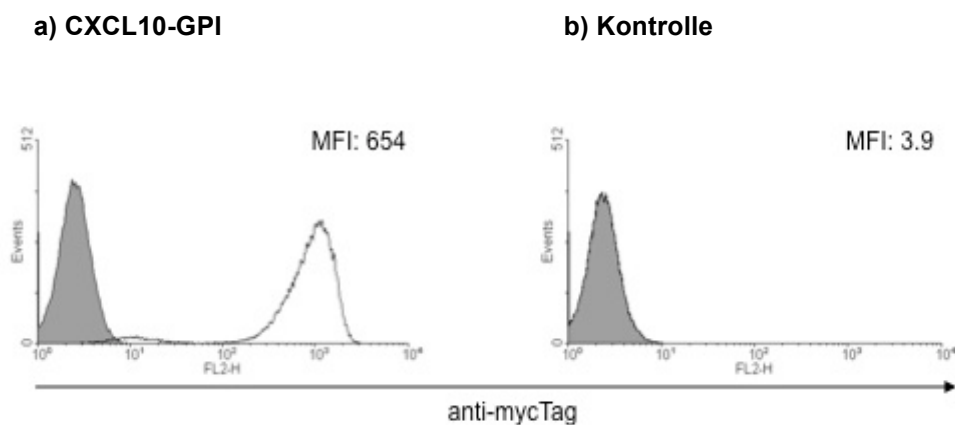
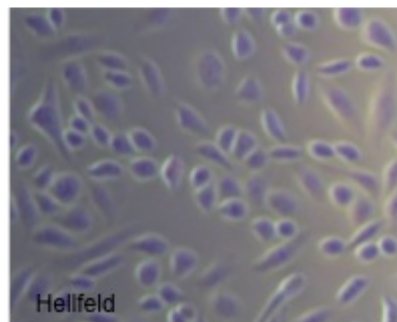
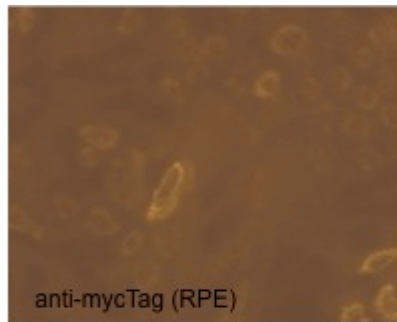


Abbildung 19 Oberflächenexpression von CXCL10-mycTag auf der Zelllinie CHO-dhfr^(-/-) nach Zellsortierung. Durchflusszytometrische Untersuchung der Oberflächenexpression von CXCL10-mycTag auf der Oberfläche der Zellen nach Inkubation mit einem spezifischen mycTag-Antikörper (schwarze Linie) sowie dem entsprechenden Isotyp (grau hinterlegt). Der Sekundärantikörper ist HRP konjugiert. Angegeben ist jeweils die MFI (MFI der Isotypkontrollen nicht gezeigt). Abbildung a) zeigt das Ergebnis für CXCL10-GPI, b) für die Negativkontrolle nach Färbung mit einem mycTag-Antikörper.

Das Histogramm zeigt nun eine einheitlich starke Oberflächenexpression des Konstruktes und lässt auf eine erfolgreiche Selektion schließen.

Gleichzeitig sollte ein Nachweis der GPI-verankerten Chemokine auch mittels Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden. Die transfizierten und, als Kontrolle, untransfizierte CHO-dhfr^(-/-)-Zellen, wurden in Schälchen ausgesät und nach Antikörperfärbung fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

a) CXCL10-muzin-GPI



b) CXCL10-GPI

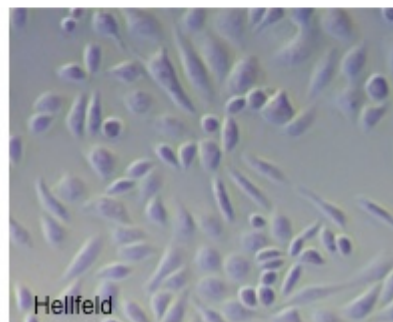
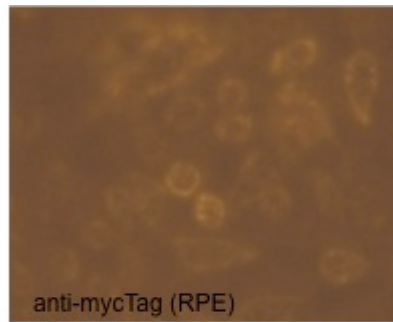


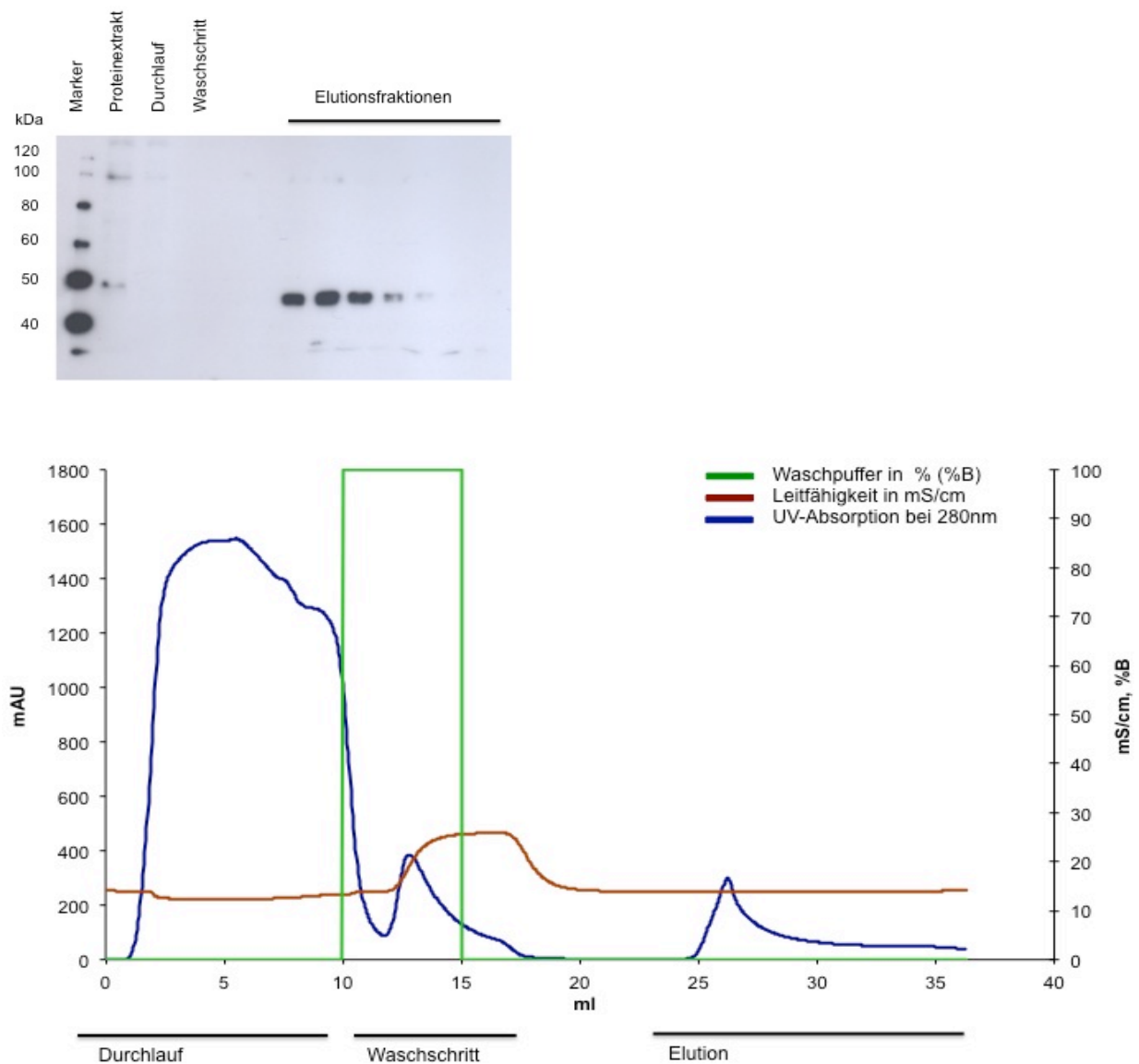
Abbildung 20: Oberflächenexpression von GPI-verankertem CXCL10-(muzin) auf CHO-dhfr^(-/-)-Zellen. Transfizierte und untransfizierte CHO-dhfr^(-/-)-Zellen wurden mit mycTag-spezifischem Antikörper gefärbt. Als Sekundärantikörper diente Streptavidin-RPE. Anschließend erfolgte die Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop. Abbildung a) zeigt das Ergebnis der Mikroskopie für GPI verankertes CXCL10-muzin; oben in der Fluoreszenz, unten im Hellfeld. Abbildung b) stellt die Oberflächenexpression von GPI verankertem CXCL10 dar; oben in der Fluoreszenz, unten im Hellfeld. Vergrößerung 175-fach.

Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte in beiden Fällen ein deutliches Fluoreszenzsignal, welches auf die Zellmembran beschränkt war. Somit konnten die zuvor gewonnen FACS-Ergebnisse bestätigt und veranschaulicht werden.

5.2.2 Proteinchemische Aufreinigung der Chemokinkonstrukte mittels FPLC

Um die GPI-verankerten Proteine aus den CHO-dhfr^(-/-)- Zellen zu extrahieren, wurden diese zunächst mit n-Dodecyl-b-D-Maltosid behandelt und steril filtriert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Proteine mittels chromatographischem Trennverfahren über eine Säule, welche mit einem Antikörper gegen den Doppel mycTag behandelt war und somit die Affinitätschromatographie ermöglichte. In der folgenden Abbildung sind Beispiele der Chromatogramme während der Aufreinigung von CXCL10-muzin-GPI sowie CXCL10-GPI dargestellt sowie die WesternBlot Analysen der Proteinfractionen.

a) Aufreinigung von CXCL10-muzin-GPI



b) Aufreinigung von CXCL10-GPI

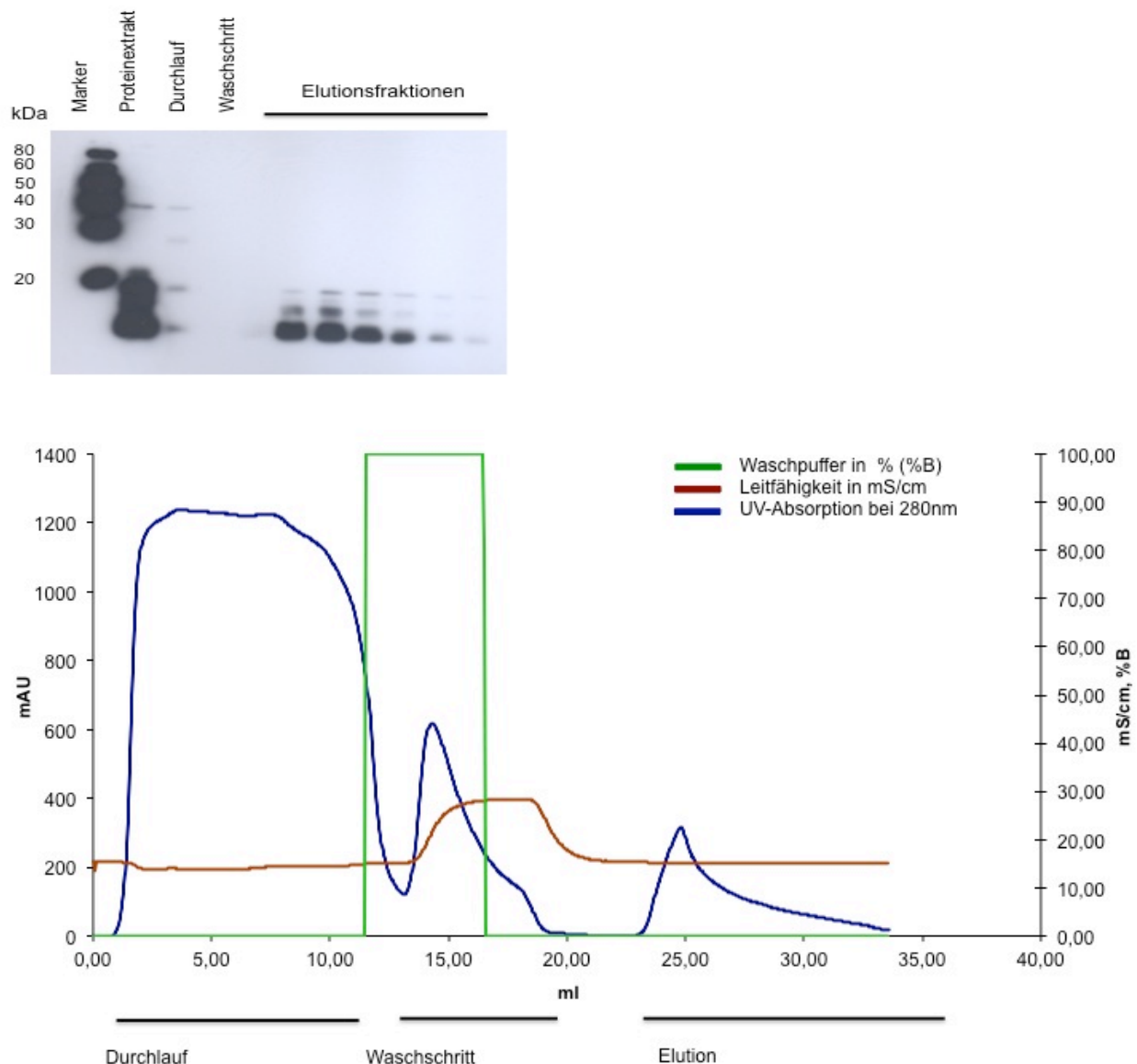


Abbildung 21: Proteinaufreinigung von CXCL10-muzin-GPI und CXCL10-GPI mittels Affinitätschromatographie. Dargestellt sind Beispielchromatogramme der Aufreinigung von a) CXCL10-muzin-GPI und b) CXCL10-GPI. Die Proteine wurden aus transfizierten CHO-dhfr^(-/-)-Zellen extrahiert und über eine myc-Antikörpersäule gereinigt. Die blaue Linie zeigt die UV-Absorption bei 280nm, gemessen in mAU (milli absorption units), als Maß für die Proteinkonzentration. Die braune Linie gibt die Salzkonzentration, gemessen in mS/cm wieder. Grün dargestellt ist der prozentuale Anteil des Waschpuffers, welcher auf die Säule aufgetragen wurde. Über den jeweiligen Chromatogrammen zu sehen sind die WesternBlot Analysen der einzelnen Fraktionen nach Färbung mit einem anti-myc-Antikörper.

Vor der Elution wurde die Säule mit Waschpuffer durchlaufen, um unspezifische Proteinbindungen zu lösen. Nach Elution mit Hilfe eines mycTag Peptids wurden die Proteinfractionen durch einen WesternBlot analysiert. Die Fraktionen mit der höchsten

Proteinkonzentration wurden gesammelt. Auf dem WesternBlot war im Fall der CXCL10-GPI Aufreinigung eine Bande bei 11-14 kDa zu erkennen. Diese zeigte das Gewicht von CXCL10 sowie des mycTags an (11,6 kDa). Bei der Aufreinigung von CXCL10-muzin-GPI lag die Bande bei 45 bis 50 kDa. Dieses Gewicht lag oberhalb des Erwarteten für CXCL10-muzin-mycTag (36,8 kDa). Dieser Unterschied könnte auf die zahlreichen Glykosilierungen der Muzindomäne zurückzuführen sein. Banden, die neben den beschriebenen bei der WesternBlot Analyse zu finden waren, wurden auf die Bildung von Oligomeren zurückgeführt.

Die Chromatogramme zeigten in der Durchlaufraktion eine hohe Proteinmenge. Auch in der Fraktion des Waschschrilles waren Proteine zu erkennen. Da die WesternBlot Analyse jedoch ergab, dass diese keine aufzureinigenden Proteine enthielten, kann von einer erfolgreichen Trennung anderer Proteine und einem demzufolge höheren Reinheitsgrad ausgegangen werden.

In der Silberfärbung wurden Verunreinigungen mit anderen Proteinen festgestellt. Diese waren jedoch, auch im Vergleich zu vorherigen Aufreinigungsversuchen, als sehr gering anzusehen.

Um die Proteinkonzentrationen zu messen, wurde ein ELISA Kit verwendet. Die gemessenen Proteinkonzentrationen waren, prozentual zu der gesamten Proteinmenge gesehen, nach der Reinigung 40-fach höher als die der Zellextrakte.

5.2.2.1 Inkorporierung von CXCL10-mycTag-GPI und CXCL10-muzin-mycTag-GPI in immortalisierte Endothelzellen

Die isolierten Proteine CXCL10 sowie CXCL10-muzin sollten in der klinischen Anwendung über den GPI-Anker in die Zellwand von Endothelzellen integriert werden. Hierfür sollte eine Reinkorporierung der Proteine *in vitro* in HMECs simuliert werden.

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen zeigt eine deutliche Präsentation sowohl von aufgereinigtem CXCL10-mycTag als auch von CXCL10-muzin-mycTag auf den mit Protein behandelten HMECs. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte HMECs.

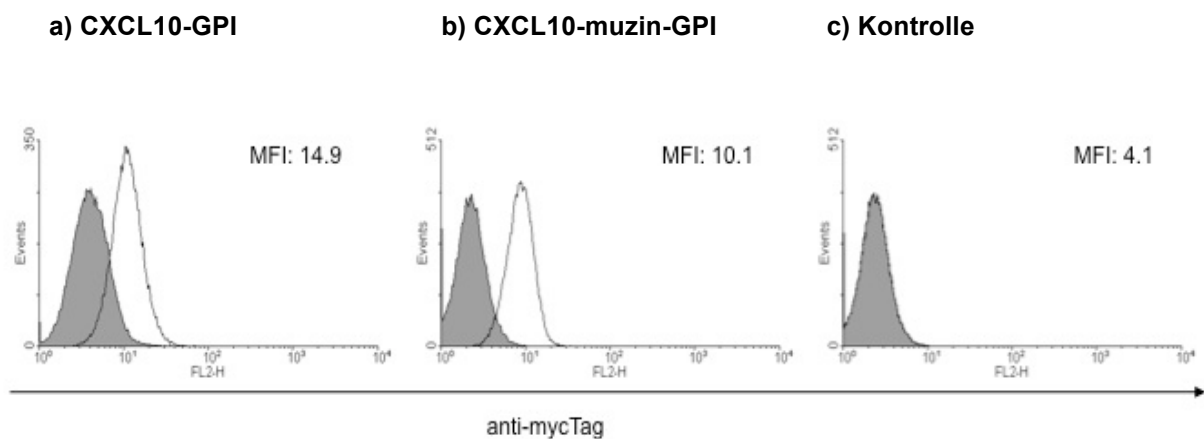


Abbildung 22: Die Proteine CXCL10-mycTag sowie CXCL10-muzin-mycTag werden in HMECs membranständig reinkorporiert. Dargestellt sind die Histogramme der FACS-Analyse nach Inkubation (1 h, 37 °C) mit dem anti-mycTag-Primärantikörper (schwarze Linie) bzw. einer Isotypkontrolle (grau hinterlegt). Als Sekundärantikörper wurde ein RPE gekoppelter Antikörper verwendet. Abbildung a) zeigt die Inkorporierung von CXCL10-mycTag-GPI, b) von CXCL10-muzin-mycTag-GPI in HMECs. Abbildung c) stellt die Negativkontrolle (HMEC unbehandelt) dar. Angegeben ist jeweils die MFI (MFI der Isotypkontrollen nicht gezeigt).

Anschließend wurde ein Verdau der Proteine mittels Phospholipase C durchgeführt, welche zu einer Freisetzung GPI-verankerter Proteine von der Zellmembran führt, indem sie zwischen dem Diazylglycerol und dem Phosphatrest des Phosphatidylinositols des GPI-Ankers schneidet. Auf diese Weise kann die Verankerung der Proteine in der Zellmembran nachgewiesen werden. Das dargestellte Histogramm demonstriert den Verlust der Oberflächensignale nach Inkubation mit PLC und somit die gelöste Verankerung von CXCL10-mycTag-GPI und CXCL10-muzin-mycTag-GPI.

a) CXCL10-GPI

b) CXCL10-muzin-GPI

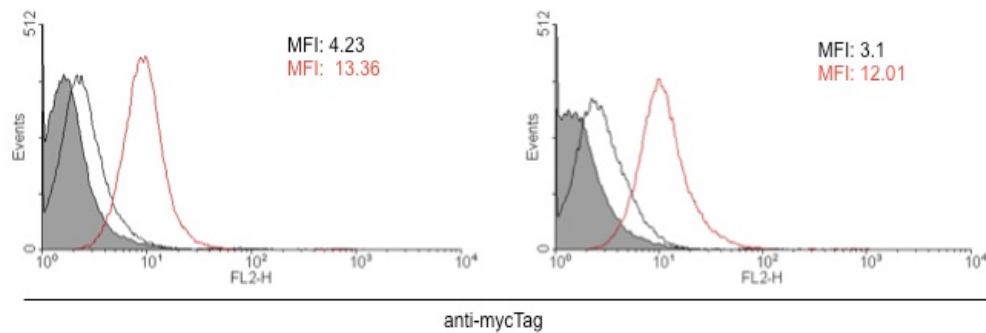
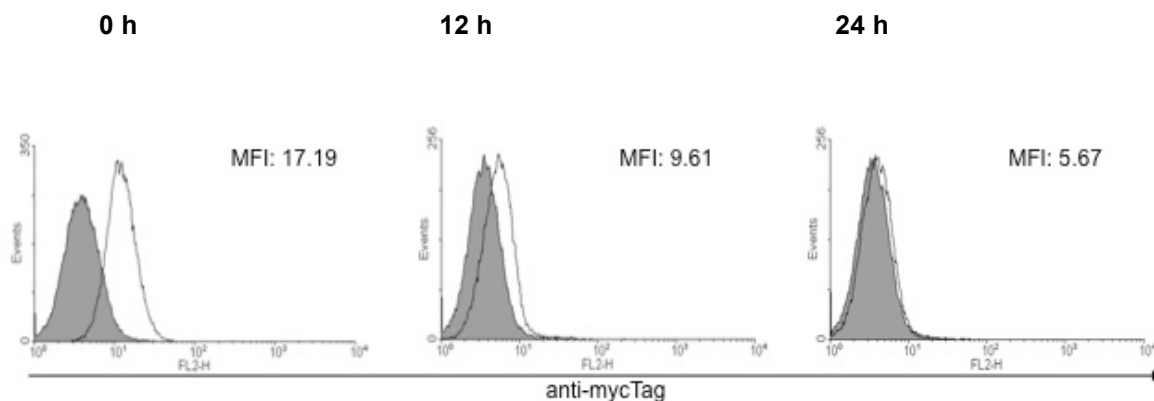


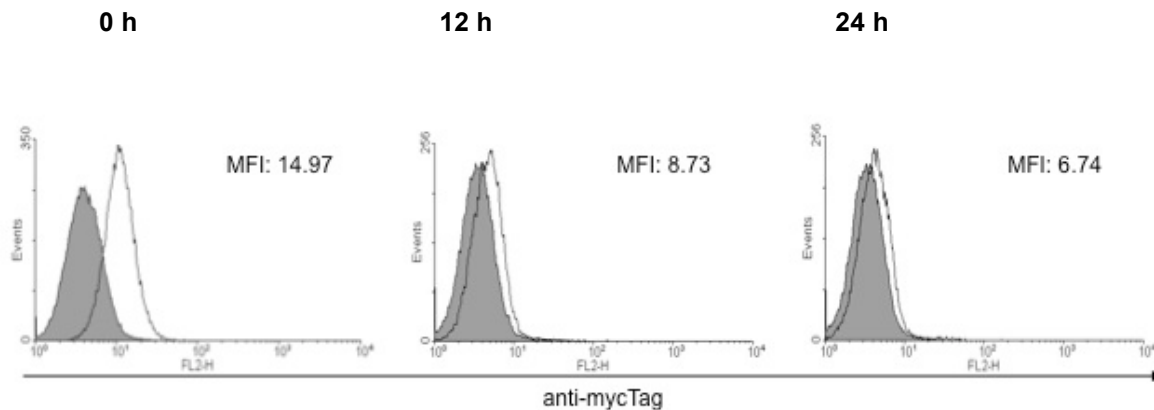
Abbildung 23: Phospholipase-C-Verdau des in die Zellmembran inkorporierten Proteins. a) Histogramm der FACS-Analyse von reinkorporiertem CXCL10-GPI. Rot dargestellt ist die Analyse vor Inkubation mit Phospholipase C, schwarz nach der Inkubation (PLC 120ng/ml; 1h; 37°C). Grau hinterlegt ist die Isotypkontrolle. b) Histogramm der FACS-Analyse von reinkorporiertem CXCL10-muzin-GPI. Rot dargestellt ist die Analyse vor Inkubation mit Phospholipase C, schwarz nach der Inkubation. Grau hinterlegt ist die Isotypkontrolle. Angegeben ist jeweils die MFI (MFI der Isotypkontrollen nicht gezeigt).

Da es sowohl für den Einsatz der Proteine in folgenden funktionellen Versuchen *in vitro* als auch *in vivo* wichtig war, festzustellen, wie lange die Proteine auf der Oberfläche präsentiert wurden, wurde die Oberflächenexpression von CXCL10-muzin-mycTag-GPI in bestimmten Zeitabständen mittels FACS-Analyse überprüft.

a) CXCL10-GPI



b) CXCL10-muzin-GPI



c) Kontrolle

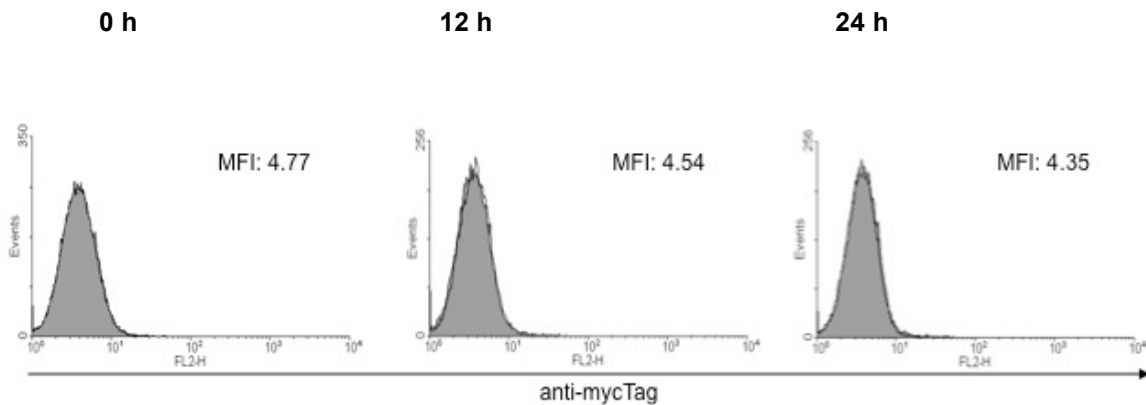


Abbildung 24: Präsentation von CXCL10-muzin-mycTag-GPI auf der Zelloberfläche in Abhängigkeit von der Zeit. Die Abbildung zeigt die durchflusszytometrische Untersuchung der Präsentation von GPI-verankertem CXCL10-muzin und CXCL10 auf der Zelloberfläche von HMECs. Wie oben beschrieben wurde die Reinkorporierung der Proteine durchgeführt und nach 0 h, 12 h und 24 h eine Messung der Oberflächenpräsentation durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Inkubation mit einem spezifischen anti-mycTag-Antikörper (schwarze Linie) oder dem entsprechenden Isotyp (grau hinterlegt), anschließend mit dem RPE gekoppelten Sekundärantikörper. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte HMECs. Angegeben ist jeweils die MFI (MFI der Isotypkontrollen nicht gezeigt). Abbildung a) zeigt die Ergebnisse der Messung für CXCL10-GPI nach 0, 12 und 24 h, b) für CXCL10-GPI und c) für die Negativkontrolle.

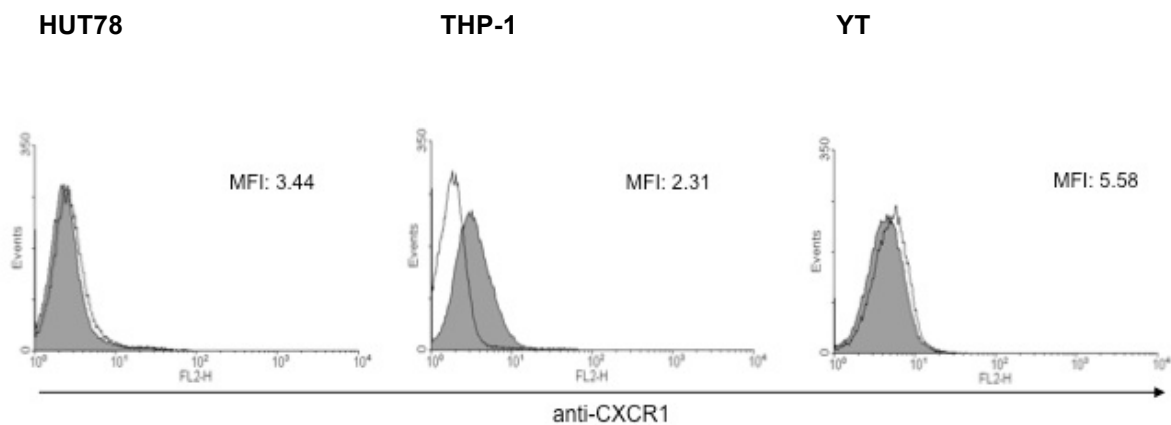
Die Histogramme zeigen, dass die Oberflächenexpression sowohl von CXCL10-muzin-mycTag-GPI als auch von CXCL10-mycTag-GPI bereits nach 12 h einen deutlichen Rückgang zeigt und nach 24 h nicht oder nur noch sehr gering vorhanden ist.

5.3 Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen unter kontinuierlichem Fluss

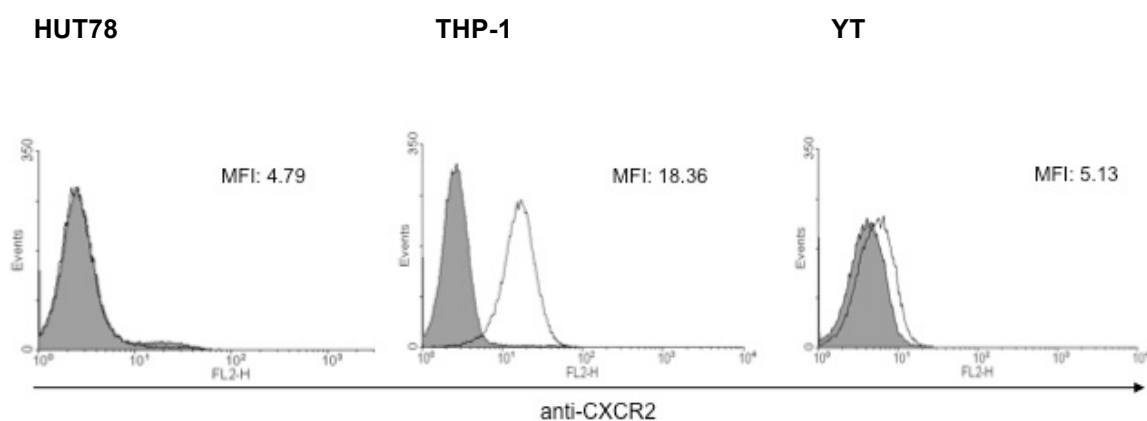
5.3.1 Nachweis der Expression von CXCR3 auf Leukozyten

Für die geplanten Adhäsionsversuche war es notwendig, eine Leukozytenzellreihe zu finden, welche den CXCL10-Rezeptor CXCR3 in möglichst großer Menge exprimiert. Hierfür wurde die Präsentation verschiedener Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche einer CD4⁺ T-Lymphozytenzellreihe (HUT78), einer Monozytenzellreihe (THP-1) sowie einer NK-Zellreihe (YT) mittels FACS analysiert.

a) CXCR1



b) CXCR2



c) CXCR3

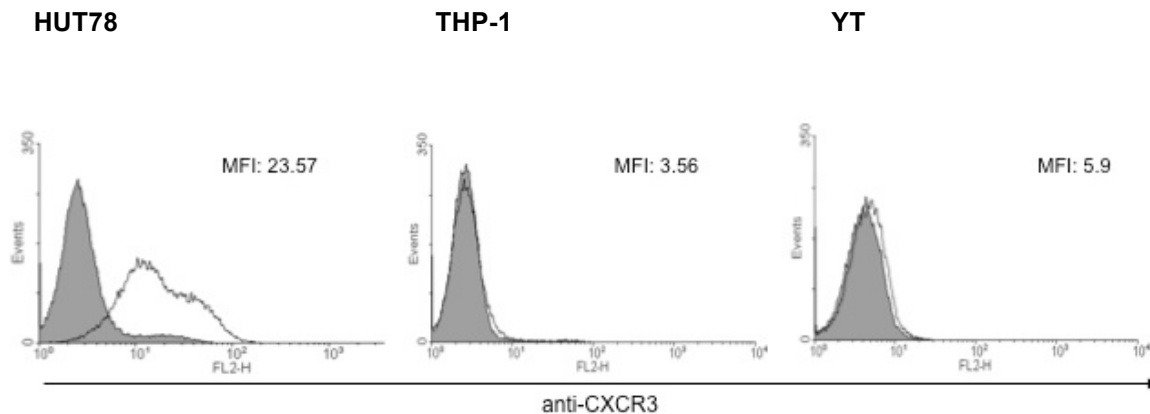


Abbildung 25: Oberflächenexpression von CXCR1-3 auf den Zellreihen HUT 78, THP-1 und YT. Dargestellt sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie nach Inkubation der Leukozyten mit einem Antikörper gegen CXCR1, 2 oder 3 (schwarze Linien) sowie dem entsprechenden Isotypkontrollantikörper (grau hinterlegt). Der Sekundärantikörper ist in allen Ansätzen RPE konjugiert. Angegeben ist jeweils die MFI (MFI der Isotypkontrollen nicht gezeigt). Abbildung a) zeigt die Expression des Oberflächenrezeptors CXCR1, b) von CXCR2 und c) die Expression des Rezeptors CXCR3.

Die durchflusszytometrische Untersuchung der YT-Zellen ergibt eine fehlende Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CXCR1-3. Es sind im Falle aller drei Rezeptoren nur gering erhöhte Fluoreszenzsignale in Bezug auf die Isotypkontrolle nachzuweisen.

Die Histogramme der FACS-Analyse zeigen bei der Untersuchung der HUT78-Zellen ein eindeutig positives Ergebnis in Bezug auf die Expression der Oberflächenrezeptoren CXCR3. Die Kurven, welche die Antikörperbindung an diese Rezeptoren darstellen, sind im Vergleich zu deren Isotypkontrollen deutlich nach rechts verschoben. Die entsprechenden Kurven der Antikörperbindung gegen CXCR1 und CXCR2 hingegen zeigen keine Rechtsverschiebung, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Rezeptoren in keiner oder nur geringer Menge auf der Oberfläche der HUT78-Zellen erscheinen.

Die Histogramme, welche die Oberflächenexpression von Chemokinrezeptoren auf THP1-Zellen darstellen, lassen für die Kurven der Antikörpermarkierung von CXCR2 eine deutliche Rechtsverschiebung gegen die der Isotypkontrolle erkennen. Die Rezeptoren CXCR1 und CXCR3 waren auf der Oberfläche der THP-1-Zellen nicht nachzuweisen.

5.3.2 HUT78 Zellen binden in geringem Maß an mit pIRES2-CXCL10-muzin-GPI transient transfizierte Endothelzellen

Um zu prüfen, ob die generierten Chemokinkonstrukte den erwarteten Effekt zeigen und Leukozyten aus dem Blutstrom rekrutieren, wurden Adhäsionsversuche durchgeführt. Diese *in vitro* Versuche sollten in Hinblick auf die Verwendung der GPI-verankerten Chemokine *in vivo* unter möglichst physiologischen Flussbedingungen durchgeführt werden. Da der Rezeptor CXCR3 auf der CD4⁺ T-Lymphozytenreihe HUT78 durchflusszytometrisch nachgewiesen worden war, konnte diese für die Versuche eingesetzt werden.

Es ist bekannt, dass die für die Transfektion verwendeten immortalisierten Endothelzellen im Vergleich mit primären Endothelzellen veränderte Eigenschaften aufweisen. Die immortalisierten Endothelzellen wurden zunächst mit IL1- β behandelt und die Wirkung des auf diese Weise stimulierten Endothels auf eine fließende Leukozytensuspension mit einer Scherkraft von 0,4 dyn/cm² beobachtet. In wiederholten Versuchen konnten nur wenige rollende bei fehlenden fest adhärierenden Leukozyten auf dem Endothel gezählt werden. Als feste Adhäsion wurde ein Leukozytenarrest von mehr als 30 sec gewertet.

Anschließend wurden HMECs unter den oben beschriebenen Bedingungen mit den Chemokinkonstrukten (pIRES2-eGFP-CXCL10-(muzin)-GPI) transfiziert und ausplattiert. Unter kontinuierlichem Fluss einer HUT78-Zellsuspension wurden über fünf min die Zell-Zellkontakte ausgezählt. Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der Adhäsionsversuche.

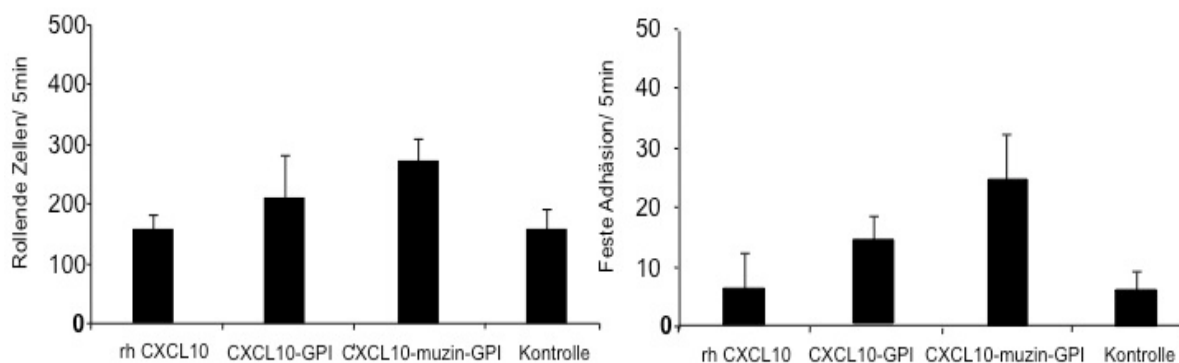


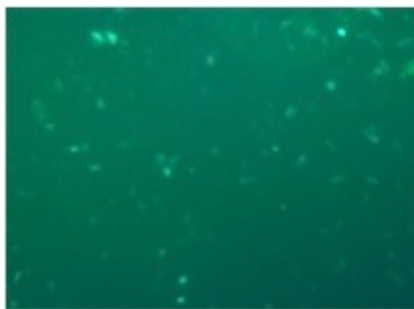
Abbildung 26: Adhäsion von HUT78-Zellen unter Fluss an transfizierte HMECs. Links dargestellt ist die Anzahl der rollenden Zellen für rh CXCL10, CXCL10-GPI, CXCL10-muzin-GPI sowie GFP-GPI als Negativkontrolle (5 min Aufzeichnung). Das rechte Diagramm gibt die Ereignisse einer festen Adhäsion wieder (5 min Aufzeichnung). Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen.

Es ist zu erkennen, dass GPI-verankertes CXCL10 mit der muzinartigen Domäne zu einer etwas größeren Anzahl sowohl an rollenden als auch an fest adhärierenden Zellen führt.

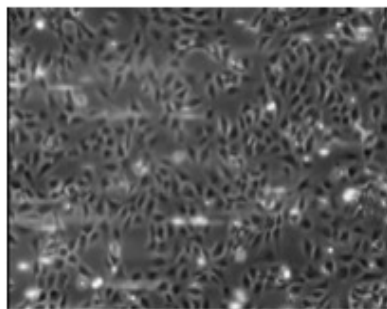
Man kann davon ausgehen, dass primär die muzinartige Domäne verantwortlich für die vermehrte Adhäsion der Leukozyten ist. Die Wirkung von Selektinen des Endothels auf die Adhäsion ist unwahrscheinlich, da ein vergleichbarer Effekt nach Stimulation der Endothelzellen mit IL1 β zuvor ausgeschlossen werden konnte.

In der folgenden Abbildung sollen die Zellkontakte nach Transfektion der Endothelzellen mit CXCL10-muzin-GPI noch einmal bildlich dargestellt werden.

Fluoreszenz



Hellfeld, 1 min



Hellfeld, 5 min

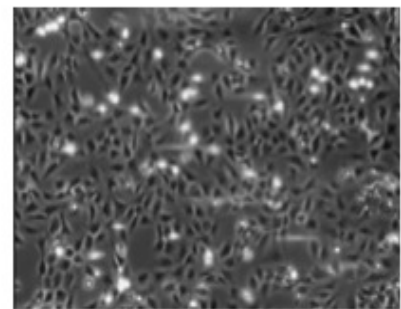


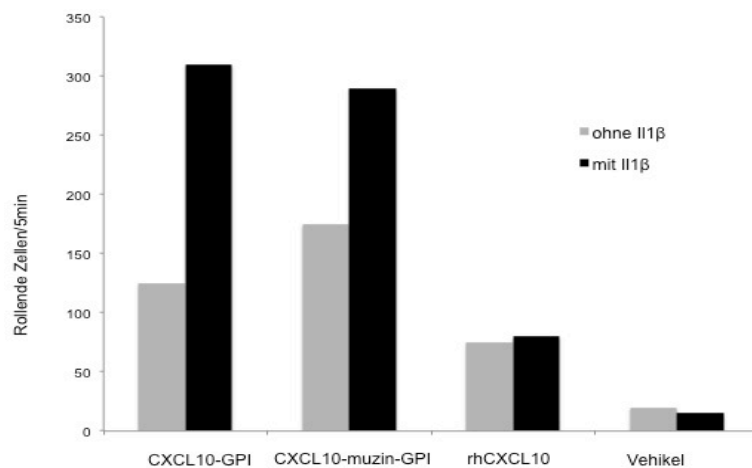
Abbildung 27: Adhäsionsversuch-Mikroskopische Aufnahme der transfizierten HMECs und der Leukozytenadhäsion. Links dargestellt sind die transfizierten Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie. Das mittlere Bild zeigt die entsprechenden Endothelzellen zu Beginn des Adhäsionsversuches. Bei Aufnahme des rechten Bildes sind 5 min vergangen.

Der Fluss der Leukozytensuspension auf den mit CXCL10-muzin-GPI transfizierten Zellen führt nach 5 min zu deutlich erkennbaren Zell-Zell-Kontakten.

5.3.3 Adhäsion von Monozytenzellen an Endothelzellen, welche die Konstrukte inkorporiert haben, unter Flussbedingungen

Da primäre Endothelzellen die Situation *in vivo* besser nachstellen, wurden für weitere Adhäsionsversuche HDBECs verwendet. In diese wurden die gereinigten Proteine inkorporiert. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Versuche dargestellt.

a)



b)

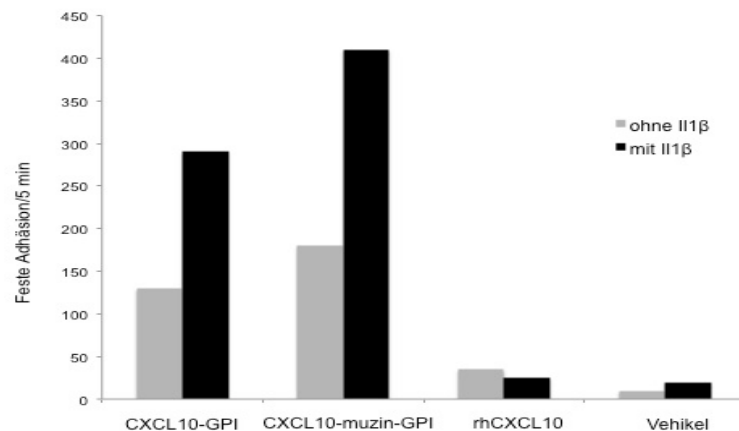


Abbildung 28: Adhäsion von YT-Zellen an HDBECs. Anzahl der a) rollenden oder b) fest adhärierenden YT Zellen an HDBECs unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

In einem Teil der Versuchsansätze erfolgte die Stimulation des Endothels mit IL1β. Als Leukozyten dienten YT-Zellen. Darüberhinaus entsprach der Versuchsaufbau dem zuvor beschriebenen. Nach Behandlung des Endothels mit CXCL10-GPI oder CXCL10-muzin-GPI ist eindeutig eine hohe Anzahl sowohl an rollender als auch fester Adhäsion festzustellen. Im Vergleich führt CXCL10-muzin-GPI zu mehr Ereignissen fester Adhäsion als CXCL10-GPI.

In allen Fällen werden die Adhäsionsereignisse durch Stimulation mit IL1 β noch deutlich erhöht. Die Behandlung der Endothelzellen mit Vehikel zeigt keinen Effekt auf die Leukozyten. Durch rekombinantes CXCL10 hingegen lässt sich ein gering positiver Effekt auf die Adhäsion beobachten.

Folgend ist ein mikroskopischer Ausschnitt des Endothelzellrasens abgebildet, über welchen die NK-Zellen geleitet werden.

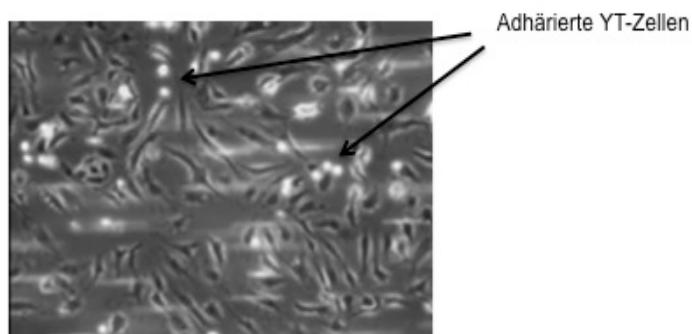


Abbildung 29: Adhäsionsversuch-Mikroskopie Aufnahme der HDBECs nach Inkorporation von CXCL10-muzin-GPI und der Adhäsion von YT-Zellen unter kontinuierlichen Flussbedingungen (nach 2 min).

Die Abbildung veranschaulicht die durch CXCL10-muzin GPI hervorgerufene feste Adhäsion der Leukozyten auf einigen Endothelzellen.

5.4 Hemmung der Zellproliferation durch CXCL10

CXCL10 soll als ERL⁻-CXC-Chemokin, wie oben beschrieben, einen hemmenden Effekt auf die Proliferation von Zellen ausüben. Über eine Hemmung der Proliferation von Endothelzellen kann dieses Chemokin die Angiogenese und somit auch das Wachstum eines Tumors hemmen. Um diesen Effekt für die aufgereinigten Proteine CXCL10-GPI sowie CXCL10-muzin-GPI nachzuweisen, wurde ein Proliferationsversuch durchgeführt. Die Messungen der Proliferationsaktivität wurden 24, 48 und 72 h nach Beginn der Inkubation von primären Endothelzellen mit dem jeweiligen Protein vorgenommen. Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse.

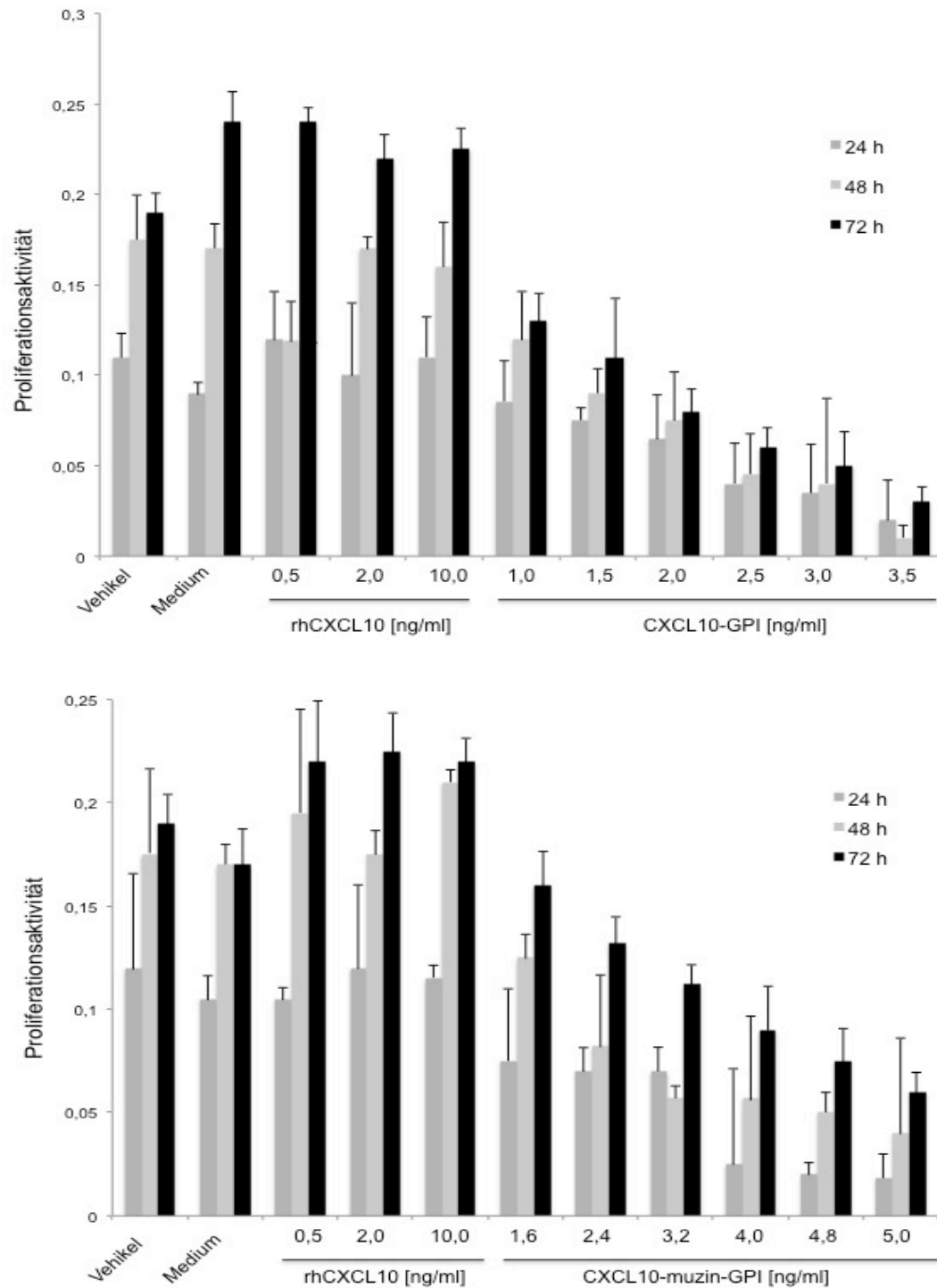


Abbildung 30: Hemmung der Proliferation von HDBECs durch CXCL10. Dargestellt sind die Ergebnisse der Proliferationsversuche nach Inkubation der HDBECs in Proliferationsmedium nach 24, 48 und 72 Stunden. Zugewetzt waren dem Proliferationsmedium entweder TSK-Säulenpuffer, rh CXCL10, CXCL10-GPI (oben) in steigender Konzentration oder CXCL10-muzin-GPI (unten) in steigender Konzentration. Anschließend erfolgte die Zugabe von MTT-Lösung (1 mg/ml). Nach Inkubation und Zentrifugation erfolgte die Lösung der entstandenen Formazankristalle in HCL-Isopropanol und die spektrophotometrische Messung bei 540 nm. Es wurden die Mittelwerte der Ergebnisse aus drei Versuchen gebildet.

Zu erkennen ist eine deutliche Hemmung der Proliferationsaktivität bei einem Einsatz sowohl von CXCL10-GPI als auch von CXCL10-muzin-GPI. Die Hemmung geschieht umso erfolgreicher, je höher die Konzentration des Proteins gewählt wird. Dem Proliferationsmedium zugesetzter TSK-Säulenpuffer, denaturiertes CXCL10-(muzin)-GPI oder Medium mit Penicillin/Streptomycin zeigte keinen Effekt auf die Proliferation im Vergleich zu der Zellproliferation in reinem Medium. Auch rekombinantes CXCL10 konnte keine Hemmung der Zellproliferation herbeiführen.

5.5 Migration von Splenozyten

Mit dem Migrationsversuch soll gemessen werden, ob murine Splenozyten selektiv in Richtung der Chemokinkonstrukte wandern. Dies stellt die Voraussetzung für die geplante Verwendung des GPI verankerten CXCL10 *in vivo* im Mausmodell dar. Der beschriebene Versuch wurde in Kooperation mit der Abteilung für Klinische Pharmakologie des Klinikums der LMU München durchgeführt.

Um für die Immunhistologie einen Anhaltspunkt zu haben, welche Leukozyten in der Umgebung der Chemokinkonstrukte zu erwarten sind, wurden die migrierten Splenozyten durchflusszytometrisch auf bestimmte Oberflächenmarker hin untersucht. Die folgende Abbildung stellt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der murinen Splenozyten, welche in Richtung der hohen Chemokinkonzentration wanderten, dar.

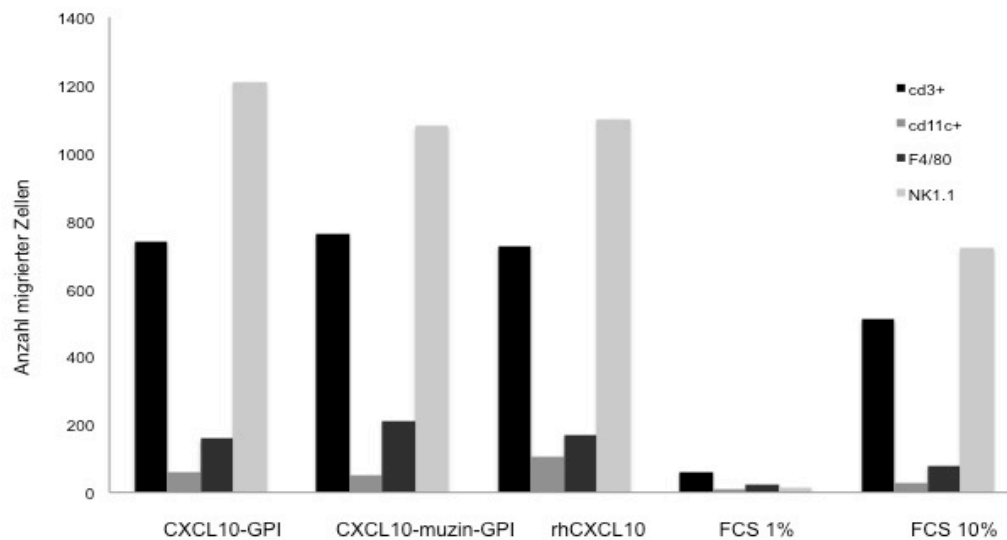


Abbildung 31: Migration von murinen Splenozyten entlang eines Chemokingradienten. Ergebnis der durchflusszytometrischen Untersuchung migrierter Splenozyten nach Inkubation mit Antikörpern gegen CD3⁺, CD11c⁺, F4/80 oder NK1.1. 10⁶ Splenozyten wurden in 100 µl RPMI in die obere Kammer eines Transwellsystems aufgenommen. Die untere Kammer wurde mit 700 µl RPMI und dem entsprechenden Chemoattraktans gefüllt. Nach 3 h Inkubation bei 37°C wurde eine FACS-Analyse der angegebenen Oberflächenmarker von dem Inhalt je 5 unterer Kammern, in welchen sich identische chemotaktische Agenzien befanden, durchgeführt. Als Positivkontrolle diente ein RPMI Zusatz von 10 % FCS, als Negativkontrolle ein Zusatz von 1 % FCS.

Das Diagramm zeigt, dass insbesondere murine T-Lymphozyten (CD3⁺) und NK-Zellen (NK1.1) von rekombinantem CXCL10 und den Chemokinkonstrukten chemotaktisch angelockt werden und sich entlang des Chemokingradienten bewegen. Ein geringerer Effekt zeigte sich in Hinblick auf die Migration von Makrophagen (F4/80), wohingegen dendritische Zellen (CD11c⁺) kaum nachzuweisen waren.

6 Diskussion

Chemokine stellen eine große Untergruppe der Zytokine dar. Sie nehmen Einfluss auf die Rekrutierung von Leukozyten und anderen Zellen. Sowohl durch Chemotaxis in Richtung der höchsten Chemokinkonzentration, als auch durch ein Zusammenspiel mit Integrinen, Selektinen und Chemokinrezeptoren, leiten Chemokine die endotheliale Transmigration von Zellen in das Gewebe ein (Marelli-Berg, 2008). Diese Rekrutierung spielt eine wichtige Rolle im Rahmen von Entzündungen. Darüber hinaus ist sie auch als wichtiger Teil der Karzinogenese zu betrachten. Chemokine können in diesem Zusammenhang die Steuerung der Immunreaktion gegen malignes Gewebe und die Angiogenese beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass die T-Zell Infiltration in Melanomen von Chemokinen abhängig ist (Harlin, 2009; Hong, 2011). Im Hepatozellulären Karzinom induzieren proinflammatorische Zytokine die CXCL10-Produktion. Die intratumorale Expression von Chemokinen korreliert hier mit der T-Zellinfiltration und dem Überleben des Patienten.

Die Beeinflussung des Immunsystems hat in der Behandlung von malignen Erkrankungen, welche in Deutschland nach Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache darstellen, bereits einen hohen Stellenwert. Die Immuntherapien stellen neben der Chirurgie, der Strahlen- sowie der Chemotherapie, einen weiteren Ansatz im Rahmen der therapeutischen Möglichkeiten dar. Für die therapeutischen Krebsimpfstoffe beispielsweise konnten im Laufe der letzten Jahre große Fortschritte erzielt werden. Im Jahr 2011 wurde der Krebsimpfstoff Sipuleucel-T für die Behandlung des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms zugelassen (Kantoff, 2010). Sipuleucel-T besteht aus körpereigenen dendritischen Zellen, die mit dem Fusionsprotein PA2024 gekoppelt werden. Dieses Fusionsprotein besteht aus dem Enzym PAP (prostataspezifische saure Phosphatase) und dem Glykoprotein GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*), wobei PAP das Tumorantigen darstellt. Diese Vakzine soll im Körper des Patienten zu einer Induktion spezifischer T-Zellen führen. Alle derzeitigen Krebsimpfungen, welche entweder dendritische Zellen, virale Vektoren oder rekombinante Proteine umfassen, sollen zu einer tumorspezifischen T-Zellantwort führen (Lienard, 2004). Der Anteil dieser tumorspezifischen T-Zellen an allen zirkulierenden CD8⁺ T-Zellen beträgt manchmal über 3% (Speiser, 2005). Trotzdem kann häufig keine Hemmung des Tumorwachstums herbeigeführt werden (Rosenberg, 2004). Eine wichtige Limitierung der Wirkungsweise dieser Impfungen stellt die mangelnde Rekrutierung der stimulierten T-Zellen in den Tumor dar.

Auch im Rahmen weiterer Immuntherapien ist die mangelnde Rekrutierung von Immunzellen häufig der limitierende Faktor. Es ist möglich, direkt eine T-Zellpopulation zu transferieren, welche eine Spezifität gegen bestimmte Tumorantigene zeigt. Dieser, als adoptive T-

Zelltherapie bezeichnete Ansatz, wurde erfolgreich in der Behandlung von EBV (Ebstein Barr Virus), CMV (Zytomegalievirus) und dem malignen Melanom angewandt (Rooney, 1995; Riddell, 1992; Mackinnon, 2008; Rosenberg, 2004). Durch eine verstärkte Rekrutierung der T-Zellen in die Umgebung des Tumors könnte jedoch eine höhere Effizienz und erfolgreichere Behandlung herbeigeführt werden.

Die Chemokine könnten durch ihre Wirkungsweise gute Voraussetzungen für eine Verbesserung der beschriebenen Immuntherapien bieten. Es wurde bereits versucht, sich die Wirkung der chemotaktischen Zytokine in der Tumorthherapie zu Nutze zu machen. Einen Ansatz stellt der Gentransfer über retrovirale Vektoren (Larin, 2004; Collins, 2004), einen anderen die direkte Injektion von rekombinantem Protein in die Umgebung des Tumors dar (Homey, 2002; Okada, 2005). Der Gentransfer bringt jedoch einige Nachteile mit sich. Die Toxizität sowie die mangelnde Kontrolle des Expressionsniveaus stehen hier an erster Stelle (Liu, 2002). Auch die Injektion von Protein in den Tumor brachte durch den Verdünnungseffekt in der Blutzirkulation nicht die erhofften Erfolge.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die GPI Verankerung des Chemokins CXCL10 die beschriebenen Probleme lösen. Nach Injektion in die Umgebung des Tumors sollte eine Reinkorporierung des Proteins in die Zellmembran stattfinden. Dieses Vorgehen wird als *tissue engineering* bezeichnet und wurde von Medof bereits 1996 beschrieben. Durch die Verankerung der Chemokine sollte ein hoher Gradient aufgebaut und eine Verdünnung des Proteins verhindert werden. Der Effekt des Chemokins sollte außerdem lokal begrenzt auftreten. Eine frühzeitige Aktivierung immunkompetenter Zellen außerhalb der Umgebung des Tumors und die Auslösung einer systemischen Immunantwort könnte hierdurch umgangen werden. Durch die Erhöhung der Konzentration von CXCL10 sollte eine gezielte Steuerung der Chemotaxis von Leukozyten sowie deren Transmigration durch das Endothel ermöglicht werden.

Eine Verbindung des Proteins mit der muzinartigen Domäne des Chemokins CX3CL1, sollte zu einer, von weiteren Stimuli unabhängigen, Adhäsion von Leukozyten an das Endothel aus dem Blutstrom heraus führen.

Verschiedene Versuche, GPI verankertes CXCL10 sowie GPI verankertes CXCL10 mit der muzinartigen Domäne aufzureinigen, scheiterten in der Vergangenheit. Weder die Heparin-Affinitätschromatographie, die Ionenaustauschchromatographie oder Gelfiltration noch Kombinationen derselben konnten die Menge an Protein reinigen, welche für die geplanten weiteren Versuche notwendig war. Auch waren in den Eluatzen Verunreinigungen durch andere Proteine in hohem Maße nachzuweisen. Polymerisierungen der Proteine forderten sehr hohe Salzkonzentrationen oder starke Änderungen des pH-Wertes um eine Elution zu

ermöglichen. Diese extremen Bedingungen wiederum hatten eine Instabilität beziehungsweise Denaturierung von Proteinen zur Folge.

Auf Grund der beschriebenen Problematik während der Aufreinigung der Proteine wurde nun eine Affinitätschromatographie mit Hilfe eines Affinitäts*tags* durchgeführt. Die Aktivität von CXCL10 ist von dem Vorhandensein des N-Terminus abhängig, so dass ein N-Terminaler *tag* nicht verwendet werden konnte. Um die Chemokinfunktion erhalten zu können, wurde als Affinitäts*tag* ein c-mycTag gewählt. Dieser wurde zwischen die GPI-Signalsequenz und die Chemokinsequenz eingefügt.

Die beiden CXCL10-GPI Varianten wurden in CHO-dhfr^(-/-) Zellen exprimiert. Der Nachweis einer erfolgreichen Expression auf der Zelloberfläche erfolgte durch eine FACS-Analyse sowie durch Immunfluoreszenzmikroskopie. Die Färbung wurde in beiden Fällen mit einem spezifischen Antikörper gegen den mycTag durchgeführt. Im Fall des Nachweises der Expression von GPI verankertem CXCL10 ohne Muzindomäne waren in der durchflusszytometrischen Untersuchung zunächst zwei Zellpopulationen zu erkennen. Es ist davon auszugehen, dass die Selektion der erfolgreich transfizierten CHO-dhfr^(-/-) Zellen hier nicht vollständig war. Die Selektion erfolgte durch Transfektion mit einem Plasmid, welches das Gen für DHFR enthielt, um den Gendefekt der CHO-Zellen zu komplementieren. Ursache für das Wachstum der unterschiedlichen Zellpopulationen in Selektionsmedium kann eine geringe oder fehlerhafte Expression des Proteins in einer Population darstellen.

Um die Zellpopulation zu isolieren, von der angenommen wurde, dass sie das gewünschte Protein auf der Oberfläche trug, wurde eine durchflusszytometrische Zellsortierung vorgenommen. Eine anschließende FACS-Analyse zeigte eine einheitliche Zellpopulation mit einem stark positiven Fluoreszenzsignal, so dass nun von einer erfolgreichen Isolation und Selektion ausgegangen werden konnte.

Die Reinigung der GPI verankerten Proteine aus CHO-dhfr^(-/-) Zellextrakten erfolgte, wie oben erwähnt, durch Affinitätschromatographie über einen c-mycTag, der durch Genfusion in die Konstrukte eingebracht worden war. Der mycTag bindet an spezifische Antikörper (9E15), welche auf einer kommerziell erwerblichen Säule gebunden sind.

Zunächst wurde eine Extraktion der Proteine aus den CHO-dhfr^(-/-) Zellen durchgeführt. In früheren Versuchen wurde zur Solubilisierung der Proteine Triton X-100 verwendet. Als Erklärung für die geringe Ausbeute im Rahmen dieses Verfahrens kann die Tatsache dienen, dass GPI-verankerte Proteine sich insbesondere in bestimmten sphingolipidreichen Bereichen der Zellmembran befinden und dort sogenannte *lipid rafts* bilden. Hieraus können die Proteine mit Triton nur schwer isoliert werden (Brown, 1992; Simons, 1997). Eine

Untersuchung der Effizienz verschiedener Detergenzien wurde in unserem Labor nach einem Protokoll von Burmgarner (2005) durchgeführt. Hier zeigte sich N-Dodecyl-b-D-Maltosid als das effektivste Detergens bei der Aufreinigung der GPI verankerten Proteine.

Die Elution des Proteins erfolgte über die kompetitive Bindung eines c-myc-Peptids an die spezifischen c-myc-Antikörper. Diese Methode erlaubte eine sehr schonende Elution des Proteins in einem annähernd neutralen pH-Bereich, wodurch eine Denaturierung der Proteine weitestgehend verhindert und der Effekt auf die Konformation minimal gehalten werden sollten. Nach der Elution wurden die Reinheit der Proteine sowie deren spezifische Konzentration bestimmt. Es zeigte sich in der Silberfärbung, dass geringe Verunreinigungen mit anderen Proteinen nicht verhindert werden konnten. Im Vergleich mit früheren Aufreinigungsversuchen konnte der Reinheitsgrad jedoch deutlich gesteigert werden. Da Proteine in nicht-nativer Umgebung häufig instabil sind und aggregieren, kann einer leichten Verunreinigung sogar ein positiver Einfluss in Hinblick auf die Funktion des Proteins zugeschrieben werden (Cromwell, 2006). Auch die gemessenen Konzentrationen der Proteine brachten zufriedenstellende Ergebnisse. Die Konzentration und der hohe Reinheitsgrad der Proteine ermöglichten somit die Durchführung der geplanten funktionellen Versuche.

Einen Nachteil der Affinitätschromatographie mit Hilfe eines *tags* stellten die hohen Kosten für das Säulenmaterial dar. Eine Säule wurde zwar mehrfach verwendet, konnte aber nur für die Aufreinigung eines bestimmten Proteins genutzt werden, um Kontaminationen zu vermeiden. Für funktionelle Versuche *in vitro* sowie insbesondere für geplante *in vivo* Versuche sind größere Proteinmengen notwendig. Die hohen Kosten stellen in Hinblick darauf ein nicht unerhebliches Problem dar.

Nach der Aufreinigung wurden die Proteine in die Zellmembran von immortalisierten Endothelzellen reinkorporiert. Der Nachweis erfolgte mittels FACS-Analyse und Fluoreszenzmikroskopie. In beiden Fällen konnte eine erfolgreiche Präsentation der Chemokine auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Um die GPI Verankerung zu demonstrieren, erfolgte ein Verdau mit PLC. Dieses Enzym spaltet den GPI Anker von der Zelloberfläche, so dass das verankerte Protein hier nicht mehr nachzuweisen ist. Die FACS Analyse bestätigte den Verlust des Oberflächensignals durch die verankerten Proteine. Der Nachweis der Verankerung ist wichtig, da Chemokine, wie oben erwähnt, über GAGs an Zellmembranen gebunden werden können. Diese Bindung entsteht eigentlich nur nach Aktivierung von Endothelzellen, sollte aber dennoch ausgeschlossen werden um die Reinkorporierung der gereinigten Proteine und somit die erfolgreiche Umsetzung eines entscheidenden Teils der ursprünglichen Idee zu beweisen.

Für das Ziel, die GPI verankerten Chemokine in die Umgebung eines Tumors zu injizieren um sich ihre Effekte an definierter Stelle zu Nutze zu machen, ist die zeitliche Veränderung der Präsentation eine wichtige Information. Es konnte in mehreren FACS-Analysen gezeigt werden, dass die Chemokinkonstrukte nach 24 h auf der Oberfläche der Endothelzellen in nur noch sehr geringem Maß nachzuweisen waren. Ursachen für ein Verschwinden des Signals auf der Zelloberfläche können einerseits eine Spaltung und Freisetzung des Proteins oder andererseits eine Endozytose mit nachfolgendem intrazellulären Abbau darstellen (Censullo, 1994).

Neben der Proteinaufreinigung wurden mikrovaskuläre Endothelzellen mit den Chemokinkonstrukten transfiziert, um zeitgleich funktionelle Versuche durchführen zu können. Wir verwendeten immortalisierte mikrovaskuläre Endothelzellen, da primäre Endothelzellen sich als wenig resistent gegenüber verschiedenen Transfektionsverfahren zeigten. Die Schwierigkeiten bei der Transfektion primärer Endothelzellen sind bekannt (Ades, 1992; Bouis, 2001) und beruhen in erster Linie auf der hohen Empfindlichkeit primärer Endothelzellen gegenüber toxischen Reagenzien. Außerdem findet hier häufig ein zytoplasmatischer Abbau der transfizierten DNA statt (Colombo, 2001). Die HMECs wurden transient transfiziert. Die Lebensdauer der DNA ist hier auf wenige Tage beschränkt, da sie dann von der Zelle abgebaut wird. Man verwendet überdrehte (*supercoiled*) DNA, weil auf diese Weise die DNA mit höherer Effizienz transkribiert wird.

Die Methode der Magnetofektion erbrachte nicht den gewünschten Erfolg. Die Transfektionsrate konnte auch durch Änderungen verschiedener Parameter nicht über wenige Prozentpunkte gesteigert werden. Auch ist die hohe Mortalität der Zellen im Rahmen dieser Methode zu nennen, obwohl die Magnetofektion eigentlich als ein sehr schonendes Verfahren beschrieben wird (Scherer, 2002).

Durch Elektroporation hingegen ließen sich Transfektionsergebnisse von über 20 % erreichen. Verwendet wurde ein Protokoll von Hernandez (2004), welches in Bezug auf die eingesetzte DNA-Menge etwas modifiziert wurde. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Zellen vor der Elektroporation in Suspension vorliegen müssen. Da adhärenzte Zellen benutzt wurden, mussten bis zur Verwendung der transfizierten Zellen für funktionelle Versuche 12-24 h vergehen. In dieser Zeitspanne kann bei transient transfizierten Zellen bereits von einem geringen Verlust der DNA ausgegangen werden. Darüber hinaus wurden auch im Rahmen der Elektroporation viele der Zellen getötet.

Um die Hypothese der Arbeit zu prüfen, dass Leukozyten durch die GPI-verankerten Chemokine aus dem Blutstrom rekrutiert werden, wurden Adhäsionsversuche unter kontinuierlichem Fluss durchgeführt. Für die Versuche wurden immortalisierte

Endothelzellen, zuvor transient transfiziert mit CXCL10-(mucin)-GPI, verwendet. Die Endothelzellen bildeten einen konfluenten Zellrasen in einem Kanal, durch den eine Leukozytensuspension mit definierter Scherkraft geleitet wurde.

Für die Durchführung der funktionellen Versuche war es nötig, eine Leukozytenzellreihe zu finden, die den Chemokinrezeptor CXCR3 exprimiert und somit CXCL10 binden kann. Die FACS-Analyse ergab, dass die CD4⁺ T-Lymphozytenreihe HUT78 diese Voraussetzung erfüllt. Auf der Monozytenzellreihe THP-1 sowie auf der NK-Zellreihe YT konnte CXCR3 nicht nachgewiesen werden. In der Literatur hingegen wird beschrieben, dass YT Zellen den Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen. Möglich wäre, dass der Rezeptor auf der von uns verwendeten Zellreihe in nur sehr geringer Menge auf der Oberfläche vorhanden ist oder dem fluoreszenzmikroskopischen Nachweis nicht zugänglich war. Hierfür könnte eine Internalisation des Rezeptors auf Grund veränderter Wachstumsbedingungen verantwortlich sein. Auch könnte eine fehlende Aktivierung durch Entzündungsmediatoren eine Ursache sein. Wir entschieden uns somit, neben Adhäsionsversuchen mit HUT78 Zellen auch Versuche mit YT-Zellen durchzuführen.

Eine Aktivierung von Endothelzellen führt zu einer Hochregulation von E-Selektin auf der Zelloberfläche. Wie oben beschrieben, ist dieses für die initiale Bindung der Leukozyten am Endothel notwendig. Nach einer Behandlung untransfizierter Endothelzellen mit IL1 β konnten in den nachfolgenden Adhäsionsversuchen nur wenige Ereignisse in Form von rollender Adhäsion und keine in Form von fester Adhäsion detektiert werden. Da nach Stimulation der HMECs keine Bindung nachzuweisen war, kann darauf geschlossen werden, dass den verwendeten HMECs die Fähigkeit fehlt, durch E-Selektin einen Leukozytenarrest herbeizuführen. Insofern bieten die Zellen gute Voraussetzungen dafür, die Wirkung der Chemokinkonstrukte auf die Leukozyten zu prüfen, ohne dass weitere Moleküle an einer Zelladhäsion beteiligt sind, welche die Ergebnisse verfälschen könnten.

Die Adhäsionsversuche mit HUT78 Zellen zeigten im Fall von GPI verankertem CXCL10-mucin sowohl eine rollende als auch eine feste Adhäsion der Leukozyten an die transfizierten HMECs. Die Ereignisse waren hier im Vergleich mit dem verankerten CXCL10 ohne die muzinartige Domäne häufiger zu sehen. Insgesamt war der Effekt der Konstrukte auf die Leukozyten jedoch geringer als erhofft. Möglich wäre, dass die Transfektionseffizienz mit den Chemokinkonstrukten von 20 bis 30 % der HMECs nicht groß genug war, um eine überzeugendere Wirkung auf die Leukozyten ausüben zu können. Die Scherkraft im Rahmen der Versuche wurde mit 0,4 dyn/cm² geringer gewählt als es *in vivo* mit 1-2 dyn/cm² zu erwarten wäre (Abbassi, 1993; House und Lipowsky, 1988). Hierdurch konnten auch schwächere Zell-Zell Interaktionen detektiert werden. Eine hohe Scherkraft kann außerdem

zu einer Verringerung der Aktivität der Muzindomäne führen und eine Adhäsion von Leukozyten verhindern (Kerfoot, 2003). Für die Versuche wurden immortalisierte Endothelzellen verwendet. Der Vorteil einer fehlenden Stimulation durch IL1 β wurde oben bereits beschrieben. Allerdings könnte das Zusammenwirken von Selektinen und Chemokinkonstrukten, wie es auch *in vivo* zu erwarten wäre, zu einem wesentlich deutlicheren Effekt auf die Leukozytenadhäsion führen.

Um diesem *setting* ein Stück näher zu kommen, wurde der Effekt der Chemokinkonstrukte auf Leukozyten nach ihrer Reinkorporierung in primäre Endothelzellen geprüft. Primäre Endothelzellen stellen die Situation *in vivo* besser nach als immortalisierte Endothelzellen. Für die zuvor beschriebenen Versuche mit transfizierten Endothelzellen waren sie jedoch nicht geeignet, da sie sich als sehr schwer zu transfizieren zeigten. Bei den Versuchen zeigte sich ein deutlicher Effekt von CXCL10-muzin-GPI und CXCL10-GPI auf die rollende und feste Adhäsion von NK Zellen. Nach Stimulation des Endothels mit IL1 β und folgender Hochregulation von Selektinen und Integrinen auf der Zelloberfläche konnte, wie erwartet, eine noch höhere Anzahl von Adhäsionsereignissen beobachtet werden. Dass sich die feste Adhäsion durch die muzinartige Domäne noch ausgeprägter zeigte, liegt an ihrer Fähigkeit, ohne vorherige Stimulation eine rollende und nachfolgend feste Bindung zu generieren (Imai, 1997; Fong, 1998; Fong, 2000). CXCL10-GPI hingegen benötigt zunächst eine durch Stimulation hervorgerufene rollende Interaktion, um diese durch die Wirkung des CXCL10 in eine feste umwandeln zu können. Diese Stimulation wäre *in vivo* gegeben, da in der Tumorumgebung häufig eine begleitende Entzündungsreaktion beobachtet werden kann.

Die Auszählung der Ereignisse im Rahmen der Adhäsionsversuche fand nicht-maschinell statt. Auf diese Weise konnten leichter Interaktionen übersehen werden. Indem nur kleine Ausschnitte ausgezählt wurden, sollte dieser Effekt jedoch weitestgehend verhindert werden. Auch spielt die Subjektivität beim Auszählen der Adhäsionen eine Rolle.

Die Entstehung neuer Blutgefäße spielt eine herausragende Rolle im Rahmen der Entwicklung eines Tumors. Eine Hemmung der Angiogenese kann zu einer starken Reduktion des Tumorwachstums führen. CXCL10, als ERL⁻-Chemokin, stellt einen potenten Inhibitor dar (Strieter, 1995a; Strieter, 1995b; Luster, 1995; Angiolillo, 1995). Um diese wichtige Eigenschaft auch für die GPI verankerten Konstrukte zu demonstrieren, wurde ein Proliferationsversuch durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein deutlich hemmender Effekt von CXCL10-muzin-GPI auf die Proliferation der verwendeten HDBECs. Die Hemmung der Proliferation zeigte sich sogar in geringerer Menge deutlicher als unter Verwendung von rekombinantem CXCL10. Diese Beobachtung könnte auf die Verankerung des Chemokins durch den GPI Anker zurückzuführen sein. Durch die hemmende Wirkung auf

mikrovaskuläre Endothelzellen könnten die Chemokinkonstrukte, neben ihren positiven Auswirkungen auf eine lokale Immunreaktion, auch durch eine Hemmung der Angiogenese die Progression eines Tumors verhindern.

In Hinblick auf die Verwendung der Chemokinkonstrukte in einem Mausmodell, wurde außerdem ein Migrationsversuch durchgeführt, um zu untersuchen, welche murinen Splenozyten sich entlang des Chemokingradienten bewegen. Wie erwartet, zeigte sich in erster Linie ein chemotaktischer Effekt auf murine T-Zellen sowie NK-Zellen.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit Fusionsproteine generiert werden, die erfolgreich auf der Oberfläche eukaryoter Zellen nachgewiesen werden konnten. Die GPI verankerten Chemokine zeigten einen positiven Effekt auf die Rekrutierung von T-Zellen und NK-Zellen aus einem Flüssigkeitsstrom *in vitro*. Auch bestätigte sich ein hemmender Effekt auf die Proliferation von mikrovaskulären Endothelzellen.

Dass die GPI verankerten Chemokine auch einen chemotaktischen Einfluss auf Leukozyten *in vivo* haben, konnte in Arbeiten von Niklas Münchmeier bestätigt werden. Es zeigte sich nach intratumoraler Injektion der Proteine eine deutlich verstärkte Rekrutierung von NK Zellen. Abzuwarten bleibt jedoch, ob auch das Tumorwachstum durch die Behandlung mit den Fusionsproteinen signifikant beeinflusst werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich auf eine Verwendung von GPI verankertem CXCL10 in der Tumorumgebung hingearbeitet, um Leukozyten zu rekrutieren oder um die Angiogenese zu beeinflussen. Neben der Fusion von CXCL10 und der muzinartigen Domäne von CXCL3 mit einem GPI-Anker können auch Fusionen mit weiteren Chemokinen oder Enzymen viele Möglichkeiten in Hinblick auf die Therapie von Malignomen bieten. Ein Fusionsprotein mit TIMP-1 beispielsweise könnte, durch die Inhibition von Matrixmetalloproteasen, die therapeutische Wirkung des GPI verankerten CXCL10 auf eine Tumorprogression deutlich verstärken.

7 Anhang

7.1 Sequenzen von CXCL10-GPI und CXCL10-muzin-GPI

CXCL10-GPI

GAATTC**CCAGTCTCAGCACCATGAATCAA**ACTGCCATTCTGATTTGCTGCCTTATCTTTC
 TGACTCTAAGTGGCATTCAAGGAGTACCTCTCTCTAGAACTGTACGCTGTACCTGCATC
 AGCATTAGTAATCAACCTGTTAATCCAAGGTCTTTAGAAAACTTGAAATTATTCCTGCAA
 GCCAATTTTGTCCACGTGTTGAGATCATTGCTACAATGAAAAAGAAGGGTGAGAAGAGA
 TGTCTGAATCCAGAATCGAAGGCCATCAAGAATTTACTGAAAGCAGTTAGCAAGGAAAG
 GTCT**AAAAGATCTCCT**GCTAGAG**AACAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGGAGCAG**
AAGTTGATCAGCGAGGAGGACCTGGCTAG**ACAACCTGTATCCCAAGCAGCGGTCATT**
 CAAGACACAGATATGCACTTATACCCATACCATTAGCAGTAATTACAACATGTATTGTGC
 TGTATATGAATGTATTATGA**GT**CGAC

CXCL10-muzin-GPI

GAATTC**CCAGTCTCAGCACCATGAATCAA**ACTGCCATTCTGATTTGCTGCCTTATCTTTC
 TGACTCTAAGTGGCATTCAAGGAGTACCTCTCTCTAGAACTGTACGCTGTACCTGCATC
 AGCATTAGTAATCAACCTGTTAATCCAAGGTCTTTAGAAAACTTGAAATTATTCCTGCAA
 GCCAATTTTGTCCACGTGTTGAGATCATTGCTACAATGAAAAAGAAGGGTGAGAAGAGA
 TGTCTGAATCCAGAATCGAAGGCCATCAAGAATTTACTGAAAGCAGTTAGCAAGGAAAG
 GTCT**AAAAGATCTCCT**GCTAG**AAATGGCGGCACCTTCGAGAAGCAGATCGGCGAGGTG**
 AAGCCCAGGACCACCCCTGCCGCCGGGGGAATGGACGAGTCTGTGGTCCTGGAGCCC
 GAAGCCACAGGGCAAAGCAGTAGCCTGGAGCCGACTCCTTCTTCCCAGGAAGCACAGA
 GGGCCCTGGGGACCTCCCCAGAGCTGCCGACGGGTGTGACTGGTTCCTCAGGGACCA
 GGCTCCCCCGACGCCAAAGGCTCAGGATGGAGGGCCTGTGGGCACGGAGCTTTTCC
 GAGTGCCTCCCGTCTCCACTGCCGCCACGTGGCAGAGTTCTGCTCCCCACCAACCTGG
 GCCAGCCTCTGGGCTGAGGCAAAGACCTCTGAGGCCCCGTCCACCCAGGACCCCTC
 ACCCAGGCCTCCACTGCGTCCTCCCCAGCCCCAGAGGAGAATGCTCCGTCTGAAGGCC
 AGCGTGTGTGGGGTCAGGGGCAGAGCCCCAGGCCAGAGAACTCTCTGGAGCGGGAGG
 AGATGGGTCCCGTGCCAGCGCACACGGATGCCTTCCAGGACTGGGGGCCTGGCAGCA
 TGGCCCACGTCTCTGTGGTCCCTGTCTCCTCAGAAGGGACCCCCAGCAGGGAGCCAGT
 GGCTTCAGGCAGCTGGACCCCTAAGGCTGAGGAACCCATCCATGCCACCATGGACCCC
 CAGAGGCTGGGCGTCCTTATCACTCCTGTCCCTGACGCCCAGGCTGCCACCCGGAGG

CAGGCTAGAGAACAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGGAGCAGAAGTTGATCAGCG
AGGAGGACCTGGCTAGCACAACCTGTATCCCAAGCAGCGGTCATTCAAGACACAGATAT
GCACTTATACCCATACCATTAGCAGTAATTACAACATGTATTGTGCTGTATATGAATGTAT
TATGAGTCGAC

Gensequenzen:

CXCL10

Muzindomäne aus CX3CL1

mycTag

GPI-Signalsequenz

Schnittstellen der Restriktionsenzyme:

GTCGAC: *Sall*

GAATTC: *EcoRI*

GCTAGC: *NheI*

TCTAGA: *XbaI*

8 Abkürzungen

Bezüglich der Standardmaßeinheiten gelten das SI-System und die Konventionen der IUPAC. Für die Aminosäuren gelten die Standardabkürzungen im Drei- und Einbuchstabencode.

Abb	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovines Serumalbumin
bp	basepair
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Copy-DNA
DNA	Desoxyribonucleid acid, Desoxyribonukleinsäure
CHO-Zellen	chinese hamster ovary Zellen, Ovarzellen aus chinesischem Hamster
CV	column volumina, Säulenvolumen
DHFR	Dihydrofolatreduktase
D-MEM	Dullbecco`s Modified eagles`s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	enhanced chemiluminescence
E.coli	Escherichia coli
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme linked immunosorbant assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence activated cell scanner
FCS	fetal calf serum

FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FPLC	fast protein liquid chromatography
FW	forward
GAG	Glukosaminoglykan
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GlcNAc	N-Azetylglukosamin
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
HBSS	Hank`s Buffer salt solution
HDBEC	Human dermal blood endothelial cells
HMEC	Human microvascular endothelial cells
HRP	Horseradish Peroxidase
HT	Hypoxanthin
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IRES	internal ribosome binding site
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetized activated cell sorting
Man	Mannose
mAU	Milli Absorption units
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
MMP	Matrix-Metalloprotease
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion

PE	Phycoerythrin
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PS	Penizillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	R-Phycoerythrin
RV	reverse
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
TARC	Thymus and activation regulated chemokine
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-bufferes saline mit Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	Unit, Einheit
V	Volumen
VCAM	Vascular adhesion molecule
VE	Volumeneinheit
VEGF	vascular endothelial growth factor
Zn	Zink

9 Literatur

- Abbassi O** et al. (1993): Neutrophil adhesion to endothelial cells. *Blood cells* 19:245-259
- Addison CL et al.** (2000a): The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR CXC+ chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol* 165(9):5269–77
- Addison CL et al.** (2000b): The CXC chemokine, monokine induced by interferon-gamma, inhibits non-small cell lung carcinoma tumor growth and metastasis. *Hum Gene Ther* 11(2):247–261
- Ades EW** et al. (1992): HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Invest. Dermatol.* 99:683-690
- Alexander SPH** et al. (2011): Guide to receptors and channels (GRAC), 5th Edition. *Br J Pharmacol* 164:1-324
- Angiolillo AL** et al. (1995): Human Interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J. Exp. Med.* 182:155-162
- Arenberg DA** et al (1996a): Interferon-gamma- inducible protein 10 (IP-10) is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases. *J Exp Med* 184(3):981–992
- Arya M** et al. (2003): Chemokines: key players in cancer. *Curr Med Res Opin* 19(6):557–564
- Arya M** et al (2007): Clinical importance and therapeutic implications of the pivotal CXCL12-CXCR4 (chemokine ligand receptor) interaction in cancer cell migration. *Tumor Biol* 28(3):123–131
- Baggiolini, M.** et al. (1994): Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC-Chemokines. *Adv Immunol* 55: 97-179
- Baggiolini M et al.** (1997): Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15:675-705
- Baggilioni M** (1998): Chemokine and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-8
- Baggiolini M und Loetscher P** (2000): Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today* 21:418-20
- Balkwill, F** (2004): Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4(7): 540-50
- Burnet FM** (1970): The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13:1-27
- Bazan JF** et al. (1997): A new class of membrane-bound chemokine with a cx3c motif. *Nature* 385:640-4

- Blanchet X** et al. (2012): Touch of chemokines. *Front Immunol.* 3:175
- Bonecchi R** et al.: Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (TH1s) and TH2s. *J Exp Med.* 187:129-134
- Boorsma DM** et al. (1994): Human growth factor (huGRO), interleukin-8 (IL-8) and interferon- gamma-inducible protein (gamma-IP-10) gene expression in cultured normal human keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 286:471-475
- Bouis D** et al. (2001): Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* 7:235-241
- Brown DA** et al. (1992): Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriches membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68:533
- Busuttil A** et al. (2009): CXCR3 ligands are augmented during the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J* 34(3):676–686
- Censullo P** et al. (1994): The fate of GPI-anchored molecules. *Braz J Med Biol Res.* 27(2):289-95
- Choi D** et al. (2012): The past, present, and future of adoptive T cell therapy. *Immune Netw* 12(4):139-47
- Collins MK** et al. (2004): Gene therapy meets vaccine development. *Trends Biotechn.* 22:623-626
- Colombo MG** et al. (2001): Differential ability of human endothelial cells to internalize and express exogenous DANN. *Cardiovasc Drugs Ther.* 15:25-29
- Combadiere C** et al. (1998): Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human cx3c chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem* 273: 23799-804
- Cooper GM** (2000): *The Cell: A Molecular Approach.*
- Cromwell ME** et al. (2006): Protein aggregation and bioprocessing. *AAPS J* 8(3):572-579
- Dal Canton** (1995): A. Adhesion molecules in renal disease. *Kidney Int.* 48(6):1687-96
- Darbonne WC** et al. (1991): Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *J Clin Invest* 88(4):1362-9
- Djafarzadeh R** et al. (2004): Exogenously added GPI-anchored tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) displays enhanced and novel biological activities. *Biol Chem* 385(7):655-63

- Donahue T** et al. (2003): Mechanosensitivity of bone cells to oscillating fluid flow induced shear stress may be modulated by chemotransport. *Journal of Biomechanics* 36(9):1363-1371
- Dustin** et al. (1987): Anchoring mechanisms for LFA-3 cell adhesion glycoprotein at membrane surface. *Nature* 329(6142):846-8
- Feil C und Augustin HG** (1998): Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 247:38-45
- Fong AM** et al. (1998): Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion and activation under physiologic flow. *J. Exp. Med.* 188:1413-9
- Fong AM** et al. (2000): Ultrastructure and function of the fractalkine mucin domain in CX3C chemokine domain presentation. *J Biol Chem.* 275(6): 3781-86
- Fujisawa N** et al. (2000): Alpha-Chemokine growth factors for adenocarcinomas; a synthetic peptide inhibitor for alphachemokines inhibits the growth of adenocarcinoma cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 126 (1):19-26
- Gattass CR** et al. (1994): Constitutive expression of interferon gamma-inducible protein 10 in lymphoid organs and inducible expression in T cells and thymocytes. *J. Exp. Med.* 179:1373-1378.
- Goda S** et al. (2000): CX3C-Chemokine, fractalkine enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrindependent and-independent mechanisms. *J Immunol* 164:4313-4320
- Gomez-Chiarri M** et al. (1993): Expression of IP-10, a lipopolysaccharide- and interferon-gamma-inducible protein, in murine mesangial cells in culture. *Am J Pathol* 142(2):433-9.
- Gupta SK und Singh JP** (1994): Inhibition of endothelial cell proliferation by platelet factor-4 involves a unique action on S phase progression. *J Cell Biol* 127(4):1121–1127
- Harlin H** et al. (2009): Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer Res* 69:3077-85
- Hernandez JL** et al. (2004): A highly efficient electroporation method for the transfection of endothelial cells. *Angiogenesis* 7:235-241
- Hesselgesser J** et al. (1994): CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Curr Biol* 7:112-21

- Homey B** et al. (2002): Chemokines: Agents for the immunotherapy of cancer? *Nature reviews Immun* 2(3):175-184
- Hong M** et al. (2011): Chemotherapy induces intratumoral expression of chemokines in cutaneous melanoma, favoring T cell infiltration and tumor control. *Cancer Res* 71:6997-7009
- House SD und Lipowsky HH** (1988): In vivo determination of the force of leukocyte-endothelium adhesion in the mesenteric microvasculature of the cat. *Circulation research* 63(3):658-668
- Huang JH** et al. (1994). Protein transfer of preformed MHC-peptide complexes sensitizes target cells to T cell cytotoxicity. *Immunity* 1(7):607-13
- Imai T** et al. (1997): Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 91(4):521-30
- Inngjerdengen M** et al. (2001): Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood* 97(2): 367-75
- Kantoff PW** et al. (2010): Sipuleucel-T immunotherapy for castration resistant prostate cancer. *N Eng J Med* 363:411-22
- Kaplan G** et al. (1987): The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *Exp. Med.* 166:1098-1108
- Kelner GS** et al. (1994): Lymphotactin : A cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266:1395-99
- Kerfoot SM** et al. (2003): Human fractalkine mediates leukocyte adhesion but not capture under physiological shear conditions; a mechanism for selective monocyte recruitment. *European Journal of Immunology* 33:729-739
- Kim CH** (2004): Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking, *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 4:343-61
- Laemmli UK** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 227:680-685
- Lapham CK** et al. (1999): Fusion of monocytes and macrophages with HIV-1 correlates with biochemical properties of CXCR4 and CCR5. *Nat Med* 5(3):303-8
- Larin SS** et al. (2004): Gene transfer approaches in cancer immunotherapy. *Gene Ther.* 11:18-25

- Lasagni L** et al. (2003): An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med* 197(11):1537–1549
- Leppert D** et al.(1995): Stimulation of matrix metalloproteinase-dependent migration of T cells by eicosanoids. *FASEB J* 9(14):1473-81
- Li J** et al. (2004): Synergistic anti-tumor effect of glykosylphosphatidylinositol-anchored IL-2 and IL-12. *The Journal of Gene Medicine* 6 (7):777-785
- Lienard D** et al. (2004): Ex vivo detectable activation of Melan-A-specific T cells correlating with inflammatory skin reaction in melanoma patients vaccinated with peptides in IFA. *Cancer Immun*:4:4
- Lindow M** et al. (2003). Viral leads for chemokine-modulatory drugs. *Trends Pharmacol Sci* 24(3):126-30
- Liu F und Huang L** (2002): Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *J Control Release* 78:259-266
- Liu H** et al. (2011): Fractalkine/CX3CR1 and atherosclerosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 412(13-14):1180-86
- Loetscher M** et al. (1996): Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med.* 184(3):963-9
- Loetscher M** et al (1998): Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol* 28(11):3696–3705
- Lortat-Jacob H** et al. (2002): Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (3):1229-34
- Luster AD** et al. (1985): Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 315:672-6
- Luster AD** et al. (1995): The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfateshared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J. Exp. Med.* 182:219-232
- Kulbe H** et al. (2004): The chemokine network in cancer-much more than directing cell movement. *Int. J Dev Biol* 48(5-6):489-96
- Kuschert GS** et al. (1999): Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* 38 [39]:12959-68

- Mackinnon S** et al. (2008): Adoptive cellular therapy for cytomegalovirus infection following allogeneic stem cell transplantation using virus-specific T cells. *Blood Cells Mol Dis* 40:63–67
- Maghazachi AA** et al. (1994): C-C chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2-activated NK cells. Role for G proteins. *J Immunol.* 153(11):4969-77
- Mantovani A** et al. (2006): Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol* 6:907-18
- Marelli-Berg FM** et al. (2008): The highway code of T cell trafficking. *J Pathol* 214:179-89
- Medof ME** et al. (1996): Cell-surface engineering with GPI-anchored proteins. *FASEB J* 10(5):574-86
- Mizoue LS** et al. (1999): Solution structure and dynamics of the CX3C chemokine domain of fractalkine and its interaction with an N-terminal fragment of CX3CR1. *Biochem* 38 (5):1402-14
- Morohashi H** et al. (1995): Expression of both types of human Interleukin 8 receptors on mature neutrophils, monocytes, and natural killer cells. *J Leukoc Biol* 57:180-7
- Moser B und Loetscher P** (2001): Leukocyte traffic control by chemokines. *Nature immunol.* 2(2):123-128
- Moser B und Willmann K** (2004): Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis* 63:84-89
- Muller A** et al. (2001): Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410: 50-56
- Muller M** et al (2010): The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in neuroimmunity-a tale of conflict and conundrum. *Neuropathol Appl Neurobiol* 36(5):368–387
- Moore MA** (2001): The role of chemoattraction in cancer metastases. *Bioessays* 23:674-676
- Murphy PM** et al. (2000): International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological reviews* 52(1):145-76
- Murphy PM** (2002): International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 54:227-9.
- Nomiyama H** et al. (2008): Extensive expansion and diversification of the chemokine gene family in zebrafish: identification of a novel chemokine subfamily CX. *BMC Genomics* 9:222

- Nomiyama H** et al. (2010): The evolution of mammalian chemokine genes. Cytokine growth factor Rev. 21: 253-262
- Nomiyama H** et al. (2012): A family tree of vertebrate chemokine receptors for a unified nomenclature. Dev.Comp.Immunol.35:705-715
- Okada N** et al. (2005): Cell delivery system: a novel strategy to improve the efficacy of cancer immunotherapy by manipulation of immune cell trafficking and biodistribution. Biol and Pharm Bull 28(9):1543-1550
- Pan Y** et al (1997): Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. Nature 387(6633):611-7
- Ploug M** et al. (1991): Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosylphosphatidylinositol. J Biol Chem 266(3):1926-33
- Premack BA** und **Schall TJ** (1996): Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. Annu Rev Immunol.12:593-633
- Premkumar DR** et al. (2001): Properties of exogenously added GPI-anchored proteins following their incorporation into cells.J Cell Biochem. 82(2):234-45
- Qingchau Zhu** et al. (2012): The role of CXC chemokines and their receptors in the progression and treatment of tumors. J Mol Hist 10.1007:1-15
- Rajagopal S** et al. (2010): Beta-arrestin- but not G protein mediated signalling by the `decoy`receptor CXCR7. Proc Natl Acad Sci USA 107:628-32
- Riddell SR** et al. (1992): Restoration of viral immunity in immu- nodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. Science 257:238–241
- Rollins BJ** et al. (1990): Cytokine activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. Am J Pathol 136(6):1229-33
- Rooney CM** et al. (1995): Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein–Barr- virus-related lymphoproliferation. Lancet 345:9–13
- Rosenberg SA** und **Dudley ME** (2004): Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autolo- gous antitumor lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA 101(Suppl 2):14639–14645.
- Rosenberg SA** et al. (2004): Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. Nat Med 10:909-15

- Rossi D** und **Zlotnik A** (2000): The biology of chemokines and their receptors. Annual Review of Immunology 18:217-242
- Salcedo R** et al (2000): Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells. FASEB J 14(14):2055–2064
- Sallusto F** et al. (2000:) The role of chemokine receptors in primary, effector and memory immune responses. Annu. Rev. Immunol. 18:593-620
- Sangiorgio V** et al. (2004): GPI-anchored proteins and lipid rafts. Ital J Biochem 53 (2):98-111
- Schäfer A** et al. (2004): Novel role of the membrane bound chemokine fractalkine in platelet activation and adhesion. Blood 103:407-412
- Schaerli P** und **Moser B** (2005): Chemokines: control of primary and memory T-cell traffic, Immunol Res 31 [1]:57-74
- Scherer F** et al. (2002): Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. Gene Ther 9:102-109
- Scholten DJ** et al. (2012): Pharmacological modulation of chemokine receptor function. BJP 165:1617-43
- Simons K** et al. (1997): Functional rafts in cell membranes. Nature 387:569
- Singh S** et al (2011): CXCR1 and CXCR2 silencing modulates CXCL8-dependent endothelial cell proliferation, migration and capillary-like structure formation. Microvasc Res 82(3):318–325
- Soto H** et al. (1998): The CC chemokine 6ckine binds the CXC chemokine receptor CXCR3. Proc Natl Acad Sci 95(14):8205–8210
- Speiser DE** et al. (2005): Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide. J Clin Invest 115:739-46
- Springer TA** (1994): Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell 76:301-14
- Springer TA** (1995): Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. Annu Rev Physiol 57:827-72
- Strieter RM** et al. (1995): The functional role of the ELR motif in CXC chemokine- mediated angiogenesis. J. Biol. Chem. 270:27348–57

- Strieter RM** et al. (1995): Interferon gamma-inducible protein10 (IP-10), a member of the C-X-C chemokine family, is an inhibitor of angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210:51-57.
- Stewart YJ und Smyth MJ** (2009): Chemokine-chemokine receptors in cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 1(1):109–127
- Tanaka Y** et al. (1993). Proteoglycans on endothelial cells present adhesion inducing cytokines to leukocytes. *Immunol today* 14 (3):111-5
- Thomas L** (1982): On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med* 55:329-333
- Umehara et al.** (2004): Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (1):34-40
- Verma RS** et al. (1992): Evidence that the hydrophobicity of isolated, in situ, and de novo-synthesized native human placental folate receptors is a function of glycosyl-phosphatidylinositol anchoring to membranes. *J Biol Chem.* 267(6):4119-27
- Vicente MM** et al. (1998): The chemokine SDF-1 α triggers a chemotactic response and induces cell polarization in human B lymphocytes. *Eur J Immunol* 28:2197-207
- Vollmer J** et al. (2009): Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv Drug Deliv Rev* 61(3):195-204
- Wang JM** et al. (1998). Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J Immunol Methods* 220:1-17
- Wang J** et al. (2006): The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25(4):573–587
- Witt DP und Lander AD** (1994): Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. *Curr. Biol.* 4(5):394-400
- Xia M** et al. (1996): Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane." *J Immunol* 156(1):160-7
- Zitvogel L** et al. (2006): Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 6:715–27.
- Zlotnik A und Yoshie O** (2000): Chemokines: a new classification system and their role in Immunity. *Immunity*. 12:121-127
- Zlotnik A** et al. (2006): The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol* 7:243

Zhang S et al. (1999): Differential effects of leucotactin-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha on neutrophils mediated by CCR1. J Immunol 162: 4938-42